



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Influencia del procesamiento de semillas de diferentes variedades de *Chenopodium quinoa* en su perfil nutraceútico y metabólico

Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previa a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través De la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Autor: Doménica Carolina Carrillo Hidalgo

Tutor: PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

Ambato – Ecuador

Septiembre 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

CERTIFICA

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 10 de agosto de 2022

.....

PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

180360185-3

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Doménica Carolina Carrillo Hidalgo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Doménica Carolina Carrillo Hidalgo

180467797-7

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

.....

Presidente de Tribunal

.....

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

C.I.1804256905

.....

Mg. Danae Fernández Rivero

C.I.175718120-9

Ambato, 16 de septiembre de 2022

DERECHO DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....

Doménica Carolina Carrillo Hidalgo

180467797-7

AUTOR

DEDICATORIA

Al Creador

Por la vida y el poder de mejorar cada día

A mi papá

Por las enseñanzas y consejos que me ha impartido día con día, por tu paciencia y tu corazón tan fuerte que hizo posible sacarme adelante y proveerme de todo lo necesario y más aun de mejorar como persona. Por las palabras asertivas que me ayudaron y me ayudaran hacer cualquier cosa que me proponga. Gracias por el amor y el apoyo incondicional.

A mi mamá

Por tu carácter que siempre me ayudo a pensar más en mí y en lo que puedo lograr, por tu amor desmedido que ha demostrado querer seguir mejorando como mamá y luchar por darnos lo mejor. Eres la mejor Susu te amo.

A mi hermana

Angie me enseñaste mucho el valor de seguir adelante, que no estamos solas en el camino de la vida, que los problemas son nada cuando estamos juntas.

A Mauri

Por tu compañía, amor y confianza en mí y darme esos ánimos que cada día necesitaba, por motivarme hacer las cosas que pensé que no podría lograrlos.

A mis amigos

Michelle, Christopher, Marco y Yonayker por su apoyo durante este proceso y su compañía, gracias por no solo ser amigos del momento sino habernos permitido conocer mucho más allá de cada uno.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato

Por ser como mi segundo hogar, donde pude más allá de obtener conocimientos fue un paso más del inicio de una vida adulta. Puedo decir ahora que he tomado la mejor decisión al pertenecer a la facultad de ciencia e ingeniería en Alimentos y Biotecnología, no cabe duda alguna, de lo que he aprendido ha ayudado para el desarrollo de capacidades y aptitudes que agradezco y me servirá el resto de mi vida.

A mi tutora

PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova, por la oportunidad de haber trabajado en el proyecto de investigación, mediante su instrucción y orientación como tutor de tesis ha sido posible lograrlo.

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHO DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I	1
MARCO TEORICO.....	1
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>).....	1
1.1.3 Composición general y sus propiedades nutricionales.....	2
1.1.4 Procesamiento de semillas de <i>C.quinoa</i>	3
1.1.5 Enfoque metabolómico basado en RMN	4
1.1.6 Análisis por RMN	5
1.1.7 <i>Machine Learning</i>	6
1.1.8 Random Forest	6
1.2 OBJETIVOS	7
1.2.1 Objetivo General.....	7
1.2.2 Objetivos Específicos.....	7
CAPÍTULO II	8
METODOLOGÍA.....	8
2.1 Materiales.....	8
2.1.1 Material Virtual.....	8
2.1.2 Software bioinformático	8
2.1.3 Equipos	8
2.1.4 Especie vegetal estudiada.....	8
2.2 Metodología	8
2.2.1 Importación de datos.....	8
2.2.2 Análisis exploratorio y estadístico	8
2.2.3 Generación y evaluación de modelos.....	9

2.2.4 Jerarquización del contenido de metabolitos	9
CAPÍTULO III	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
3.1 ANÁLISIS EXPLORATORIO Y ESTADÍSTICO	10
3.1.1 Visualización de los metabolitos.....	10
3.1.2 Prueba de Normalidad.....	12
3.1.3 Prueba de Pos – hoc o de significancia	14
3.1.4 Análisis de correlación.....	16
3.2 GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE MODELOS	19
3.3. ANÁLISIS NUTRACEÚTICO	21
3.3.1 <i>Aminoácidos</i>	21
3.3.2 <i>Ácidos orgánicos</i>	23
3.3.3 Carbohidratos	25
3.3.4 <i>Otros nutrientes</i>	26
CAPÍTULO IV	28
CONCLUSIONES	28
4.1 Conclusiones	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS	35
ANEXO 1: Metabolitos	35
ANEXO 2: TABLAS TUKEY COMPLETAS.....	49
ANEXO 3: RStudio	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	12
Distribución del tratamiento de Control (C).....	12
Tabla 2.	12
Distribución del tratamiento de lavado (W)	12
Tabla 3.	13
Distribución del tratamiento de cocción (Ck)	13
Tabla 4.	13
Distribución del tratamiento de lavado y cocción (Wck)	13
Tabla 5.	13
Distribución del tratamiento germinación (G)	13
Tabla 6.	15

Tukey reducida del tratamiento de control (C)	15
Tabla 7.	15
Tukey reducida del tratamiento de lavado (W)	15
Tabla 8.	15
Tukey reducida del tratamiento de cocción (Ck)	15
Tabla 9.	15
Tukey reducida del tratamiento de lavado y cocción (WCk).....	15
Tabla 10.	16
Tukey reducida del tratamiento de germinación (G).....	16
Tabla 11.	35
Metabolitos	35
Tabla 12.	49
Tukey del tratamiento de control (C)	49
Tabla 13.	50
Tukey del tratamiento de cocción (Ck)	50
Tabla 14.	51
Tukey del tratamiento de lavado (W).....	51
Tabla 15.	51
Tukey del tratamiento de lavado y cocción (WCk).....	51
Tabla 16.	51
Tukey del tratamiento de germinación (G)	52

ÍNDICE DE TABLAS

Figura 1.	10
Diagramas de violín de los tratamientos C, W, Ck, WCk y G.....	10
Figura 2.	17
Correlación de los metabolitos para cada tratamiento: C, W, Ck, WCk y G	17
Figura 3.	20
MDA variables	20
Figura 4.	21
MDA tratamientos	21
Figura 5.	22
Heatmap aminoácidos	22
Figura 6.	24
Heatmap ácidos orgánicos	24
Figura 7.	25

Heatmap carbohidratos	25
Figura 8.	26
Heatmap otros nutrientes	26
Figura 9.	53
Entorno de trabajo RStudio	53

RESUMEN

El propósito de esta investigación consistió en el análisis de metabolómica por RMN realizado con tres cultivares de quinua con 5 tratamientos incluido el control. Los resultados obtenidos por Lalaleo et al., (2020) en el proyecto Differentiating, evaluating, and classifying three quinoa ecotypes by washing, cooking and germination treatments, using proton nuclear magnetic resonance-based metabolomic approach, fueron la base para el desarrollo de este estudio. Los datos crudos obtenidos fueron valores resultantes de la integración de los picos del espectro de cada muestra analizada y datos de la correcta agrupación de cada ecotipo.

El análisis exploratorio de grupos de datos provenientes de distintos cultivares de quinua permitió identificar los metabolitos distribuidos normalmente en el grupo control y en los que se aplicaron algún tipo de tratamiento.

La discriminación entre el tipo de procesamiento de la semilla y cultivar se realizó mediante Random Forest. Cuando se analizó la variedad como variable de importancia se determinó que los aminoácidos y ciertos nutrientes son los de mayor relevancia para evaluar la precisión del modelo.

Finalmente, se evaluó el aporte nutraceútico de cada variedad y tratamiento, en función a la categorización. En los aminoácidos se identificó que el tratamiento de germinación (G) tiene mayor actividad metabólica en las tres variedades. En ácidos orgánicos, el ácido fórmico y pirúvico muestran mayor correlación directa en Ck y Wck. En los carbohidratos el tratamiento G con mayor correlación directa exhibió la galactosa. El tratamiento (G) con mayor correlación directa en todas sus variedades con varios metabolitos en el grupo otros nutrientes.

Palabras clave: *Chenopodium quinoa*, metabolómica, RNM, Machine Learning, metabolitos diferenciales.

ABSTRACT

The purpose of this research consisted of the NMR metabolomics analysis performed with three quinoa cultivars with 5 treatments including the control. The results obtained by Lalaleo et al., (2020) in the project Differentiating, evaluating, and classifying three quinoa ecotypes by washing, cooking and germination treatments, using proton nuclear magnetic resonance-based metabolomic approach, were the basis for the development of this study. The raw data obtained were values resulting from the integration of the spectrum peaks of each sample analyzed and data from the correct grouping of each ecotype.

The exploratory analysis of data groups from different quinoa cultivars allowed us to identify the normally distributed metabolites in the control group and in those that received some type of treatment.

Discrimination between the type of seed processing and cultivar was performed using Random Forest. When the variety was analyzed as an important variable, it was determined that amino acids and certain nutrients are the most relevant to evaluate the accuracy of the model.

Finally, the nutraceutical contribution of each variety and treatment was evaluated, based on the categorization. In the amino acids, it was identified that the germination treatment (G) has greater metabolic activity in the three varieties. In organic acids, formic and pyruvic acid show the greatest direct correlation in Ck and Wck. In carbohydrates, treatment G with the highest direct correlation exhibited galactose. The treatment (G) with the highest direct correlation in all its varieties with several metabolites in the other nutrients group.

Key words: *Chenopodium quinoa*, metabolomics, Machine Learning, differential metabolites.

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

1.1.1 Generalidades

El derecho a la alimentación es un derecho universal que establece que todas las personas deben tener acceso a una alimentación adecuada, así como acceso a los recursos necesarios, de forma sostenible y segura. La seguridad alimentaria sigue siendo una prioridad y relevante de muchas naciones. Por lo que el mundo ha estado haciendo progresos significativos en la reducción del hambre. De hecho, en 2000, los líderes mundiales se unieron a las Naciones Unidas y a la sociedad civil para comprometerse a cumplir ocho Objetivos de Desarrollo del Milenio para 2015: el primero de los cuales es "erradicar la pobreza extrema y el hambre" (**Organización de las Naciones Unidas, 2015**).

Sin embargo, la demanda actual de alimento a nivel mundial está en incremento, afecta al 9,9 por ciento de las personas en todo el mundo. De 2019 a 2020, el número de personas desnutridas creció hasta en 161 millones, una crisis impulsada en gran medida por los conflictos, el cambio climático y la pandemia de COVID-19 (**McBride et al., 2021**).

Entre ellos debido a sus características de tolerancia al estrés y sus propiedades nutricionales y biológicas, la quinua ha sido descrita como “uno de los granos del siglo XXI”. En 2013, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) lanzó el Año Internacional de la Quinua para promover la siembra, producción, conservación, consumo e investigación sobre esta planta.

Además, investigaciones recientes se centraron en los constituyentes químicos y las propiedades de la quinua, la han hecho ganar reconocimiento como un alimento funcional y nutracéutico (**Antognoni et al., 2021**).

1.1.2 Quinua (*Chenopodium quinoa*)

Chenopodium quinoa, se distribuye mundialmente e incluye 250 especies con una gran diversidad. Las especies de *Chenopodium* cultivadas y recolectadas han sido parte de las culturas precolombinas (Tiahuanacotan e Inca). Originaria de la región

andina de Bolivia y Perú, la quinua se ha cultivado en estas áreas durante los últimos 50 siglos. Para los Incas, la quinua era un cultivo muy importante junto con el maíz y la papa. Además de su papel en la nutrición humana y animal, la quinua tenía un valor sagrado como regalo de los dioses. Se cultiva principalmente en Bolivia, Perú, Ecuador, Argentina y Chile (**Antognoni et al., 2021**).

La planta es capaz de tolerar condiciones ambientales extremas (salinidad, frío, radiación solar y sequía). Su variabilidad genética es grande, con cultivares de quinua adaptándose a crecimiento en una amplia gama de ambientes desde los 20° de latitud norte en Colombia hasta los 40° de latitud Sur de Chile, y desde el nivel del mar hasta una altitud de 3.800 m (**Hernández, 2019**). La alta adaptabilidad de este cultivo a diversos hábitats agroclimáticos y condiciones edáficas ha incrementado los rendimientos de diversas variedades en países fuera de América del Sur. Así, la producción mundial de quinua se ha incrementado en los últimos años y estuvo cerca de 150.000 toneladas en 2016.

1.1.3 Composición general y sus propiedades nutricionales

La semilla de quinua es un pseudocereal importante para la nutrición humana, es originaria de la Región Andina. El valor nutricional excepcional se base en su alto contenido de proteínas (15% aproximadamente) con un equilibrio adecuado de aminoácidos esenciales, alto contenido de vitaminas y también compuestos nutraceuticos como los flavonoides (**Tabatabaei et al., 2022**). Según **Contreras et al., (2019)** esta semilla es una excelente fuente de complejo B, vitaminas E y C, así como de minerales, como Ca, Fe, Mg, Mn, P, K y Zn. Además, contiene ácidos grasos saludables, alto contenido en fibra y proteínas ricas en lisina.

Según **Angeli et al., (2020)** se han obtenido en extractos de quinua cantidades considerables de ácidos ferúlico, sinapínico y gálico, kaempferol, y isorhamnetina. Estos compuestos están vinculados a un efecto inhibidor sobre proliferación y motilidad de las células del cáncer de próstata.

Puede producir una variedad de metabolitos con amplios espectros de bioactividades. Se han identificado al menos 193 metabolitos secundarios de la quinua en los últimos 40 años. Incluyen principalmente ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides, esteroides y compuestos que contienen nitrógeno (**Mora et al., 2022**). Estos

metabolitos desempeñan diversas funciones fisiológicas y papeles ecológicos contra microorganismos dañinos, pájaros e insectos. También exhiben características beneficiosas para los seres humanos, incluidos los antidiabéticos, anticancerígenos, citotóxicos, antimicrobianos, actividades antiinflamatorias, inmunorreguladoras y adyuvantes (**Lin et al., 2019**).

1.1.4 Procesamiento de semillas de *C. quinoa*

Durante la brotación de las semillas tienen lugar una multitud de procesos bioquímicos, que conducen a cambios radicales en la composición de los metabolitos primarios y secundarios, lo que podría resultar en un cambio en el perfil de compuestos fenólicos intrínsecos y la actividad antioxidante, es decir en su perfil nutraceútico (**Carciochi et al., 2014**). Sin embargo, el procesamiento para la germinación puede demostrar ser una buena manera de mejorar el valor nutritivo y las cualidades saludables de algunas semillas o perjudicar de acuerdo con las condiciones de tratamiento que se sometan.

En una investigación realizada por **Kim et al., (2004)**, han demostrado que las semillas germinadas de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench) aumentaron notablemente el contenido de polifenoles a medida que avanzaba la brotación. Mientras que **Megat & Azrina, (2017)** han observado una disminución en los compuestos fenólicos totales en el caso de la soja germinada y el maní, lo que significa que los cambios en los niveles de compuestos nutraceúticos después de la germinación dependen de las especies de plantas y las condiciones de germinación utilizadas.

Los granos de quinua al estar cubiertos por una fina capa de compuestos glucósidos llamados saponinas que da un sabor amargo al grano y son potencialmente tóxicas si se ingieren en grandes cantidades, debido a su actividad hemolítica. En consecuencia, los granos suelen lijarse y lavarse utilizando diferentes métodos para eliminar su amargor (**Mhada et al., 2020**). Además, para que sea apto para el consumo, es obligatorio cocer los granos. El procesamiento y la cocción alteran el perfil nutricional a través de muchos mecanismos (erosión física, calor y solubilidad en agua); por lo tanto, se vuelve importante evaluar el efecto de diferentes métodos de procesamiento y cocción en el valor nutricional para maximizar el beneficio al consumirlo (**Tumpaung et al., 2021**).

1.1.5 Enfoque metabolómico basado en RMN

Los efectos generados por las diferentes condiciones experimentales inciden directamente en el contenido de metabolitos de las especies vegetales, por lo que la metabolómica proporciona una visión global de los metabolitos específicos y no específicos que están presentes, y así discriminar entre cada uno de ellos en base a una construcción de su perfil metabolómico (Ferrer, 2019; Lalaleo et al., 2020).

El estado metabólico de un organismo depende de su genoma, transcriptoma, proteoma, epigenoma, microbioma y exposoma (medio ambiente). Así la metabolómica, es el estudio de moléculas (<1500 Da) en sistemas vivos, proporcionando información con un alto potencial para describir con precisión el estado fisiológico. Los dos enfoques más exitosos para determinar el estado metabólico han sido la espectrometría en masas (EM) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) (Markley et al., 2017).

La metabolómica basada en RMN es una herramienta importante para el estudio de los sistemas biológicos y se ha aplicado en diversos organismos. La RMN es capaz de proporcionar una "visión holística" de los metabolitos bajo ciertas condiciones, y por lo tanto es ventajosa para los estudios metabolómicos (H. K. Kim et al., 2010).

En particular, la espectroscopia de RMN es un método analítico que no es destructivo, no sesgado, fácilmente cuantificable, requiere poca o ninguna cromatografía de separación, tratamiento de muestra o derivatización química, y permite la identificación rutinaria de nuevos compuestos. Además, la RMN es altamente automatizable y excepcionalmente reproducible, lo que hace que los estudios de metabolómica a gran escala de alto rendimiento sean mucho más factibles (Emwas et al., 2019).

Es así como permite la detección simultánea de: diversos grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, alcaloides, terpenoides, etc.); y una gran cantidad de metabolitos primarios (azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc.) (Lalaleo et al., 2020). Al combinar con el análisis estadístico multivariado, ¹H RMN es una herramienta mucho más poderosa siendo utilizada para maximizar el uso de los datos obtenidos. Siendo esto útil para combinar perfiles químicos en aplicaciones basadas en especies vegetales, es decir; al desarrollar dispositivos de control de calidad para

productos consumibles o botánicos; al determinar patrones o marcadores de compuestos que sean herramientas para identificar especies vegetales; y por último al determinar compuestos que alteran la resistencia de las plantas a enfermedades causadas por plagas (Wishart, 2019).

1.1.6 Análisis por RMN

Según H. K. Kim et al., (2010) y Lalaleo et al., (2020), el protocolo de rutina dirigido al análisis de compuestos de polaridad moderada a alta puede establecerse en cuatro etapas. Es importante la toma de muestras, si el propósito es evaluar cambios específicos en el metaboloma, se debe evitar o reducir la degradación de compuestos, mediante técnicas de enfriamiento rápido con nitrógeno líquido y preservadas hasta la experimentación. **1) Preparación de la muestra para su extracción.** Se realiza el secado mediante liofilización, previa trituración con nitrógeno líquido. Se procede al pesado una vez este se encuentre seco (la cantidad adecuada de materia en seco se encuentra entre 50 y 100 mg) y se coloca en un tubo para su posterior extracción. **2) Extracción.** Las características fisicoquímicas de las muestras (por ejemplo, pH, fuerza iónica, composición del disolvente) deben ser constantes. Para cumplir con estos requisitos, las muestras deben estar en un estado uniforme antes de la extracción, también la utilización de una solución tampón, ayuda a equilibrar y homogenizar el pH para evitar cambios en las señales de RMN. Se realiza una sonicación y finalmente la clarificación de la fase líquida mediante la técnica de centrifugación. Se usa metanol deuterado en un tampón de fosfato mono potásico (90 mM, pH 6.0), como el disolvente cotidiano para este tipo de análisis con una concentración final de 0.01% del estándar interno, TPS o ácido Trimethylsilyl propanoico. **3) Experimento de resonancia.** Se realiza en el equipo de resonancia una vez el extracto este clarificado. El análisis de protón de hidrogeno (^1H NMR) es ideal para la extracción de datos para la metabolómica, debido a su rapidez (entre 5-10 min) y a su alta reproducibilidad. **4) Extracción de datos.** Una vez concluido el experimento de resonancia, se obtienen los espectros de protón de cada una de las muestras. Estos espectros se analizan individualmente con softwares específicos tales como Chenomx NMR Suite que permiten la identificación y cuantificación de los distintos picos del espectro. En esta etapa, cualquier región que contenga señales del disolvente son suprimidas ya que no son relevantes para los posteriores análisis estadísticos.

1.1.7 Machine Learning

El aprendizaje automático o machine learning engloba los algoritmos o modelos estadísticos que pueden identificar patrones y hacer hipótesis o inferencias basadas en el aprendizaje de los conjuntos de datos observados (**Cuperlovic, 2018**).

Según **O'Shea y Misra, (2020)** el aprendizaje automático (ML) utiliza datos experimentales para optimizar la agrupación en clústeres o la clasificación de muestras o características, que se pueden utilizar para predecir el comportamiento o las propiedades de los sistemas. Los algoritmos utilizados en ML se pueden agrupar según su modelo de aprendizaje pueden ser: Supervisado y No Supervisado. Para el primero los datos de inicio o entrada son denominados datos de entrenamiento, por lo que tienen ya el resultado conocido. Por el contrario, para el segundo grupo estos datos tienen resultado desconocido. El modelo por medio de cálculos matemáticos puede identificar patrones y hacer hipótesis o inferencias basadas por similitud o tendencia (**Varmuza et al., 2009**).

1.1.8 Random Forest

En el presente trabajo nos enfocaremos en el uso del método Random forest (RF) para hacer predicciones. RF es un clasificador extremadamente fiable y robusto. Construye un conjunto de datos, es decir, una agregación de predictores estructurados en forma de árbol. En RF, cada árbol se construye de forma independiente utilizando una muestra bootstrap de los datos originales (la muestra "embolsada"). Estos datos de entrenamiento se utilizan para construir el modelo de clasificación, los datos que no se muestrearon utilizando el bootstrap se denominan muestra fuera de bolsa (**Ghosh et al., 2020**). Dado que estos datos no se utilizaron en la construcción del modelo, pueden utilizarse como conjunto de datos de prueba, que pueden utilizarse para evaluar la exactitud de la clasificación de forma insesgada, calculando el "error fuera de bolsa". También se calcula una medida de la importancia variable de la clasificación considerando la diferencia entre los resultados de la versión original y permutada aleatoriamente del conjunto de datos. La validación cruzada no es necesaria, ya que la RF se estima a partir de las muestras Bootstrap (**Cuperlovic, 2018**).

Este modelo de predicción se ha hecho popular como herramienta de detección de biomarcadores en varios estudios de metabolómica. Tiene la capacidad de lidiar con

los datos que faltan y con los problemas de sobreajuste. Además, también puede abordar conjuntos de datos de alta dimensión sin la eliminación de características como requisito (Pomyen et al., 2020).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Analizar la influencia del procesamiento de diferentes variedades de semillas de *Chenopodium quinoa* en su perfil nutraceutico y metabólico.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar un análisis exploratorio de grupos de datos provenientes de distintos cultivares de quinua.
- Aplicar Machine Learning como herramienta de discriminación entre tipo de procesamiento de la semilla y cultivar.
- Elaborar un análisis de grupos para jerarquizar los cultivares de quinua según su aporte nutraceutico.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Material Virtual

Bases de datos

Artículos científicos

2.1.2 Software bioinformático

Plataforma de RStudio Team (2020).

Programa Excel de Microsoft Corporation (2018).

2.1.3 Equipos

Laptop

2.1.4 Especie vegetal estudiada

Chenopodium quinoa

2.2 Metodología

2.2.1 Importación de datos

Para este proyecto se utilizó un conjunto de datos crudos correspondientes al estudio de metabolómica por RMN realizado con 3 cultivares de quinoa con 6 réplicas biológicas y 5 tratamientos incluido el control. Estos datos son parte de la publicación “Differentiating, evaluating, and classifying three quinoa ecotypes by washing, cooking and germination treatments, using ¹H NMR-based metabolomic approach” publicado por Lalaleo et al., 2020. Los datos se encuentran ordenados en una tabla de Excel, la cual contiene la siguiente información: tipo de cultivar, tratamiento y valores de concentración (mM) de cada metabolito identificado. La importación y manipulación de los datos se realizó mediante el uso de Microsoft Excel y Rstudio.

2.2.2 Análisis exploratorio y estadístico

La visualización de los datos de metabolitos consistió en: (1) Transformar los datos mediante el método Unit-Variance (UV) o llamada también autoscaling, se aplica comúnmente y utiliza la desviación estándar como factor de escala. Después del autoescalado, todos los metabolitos tienen una desviación estándar de uno y, por lo tanto, los datos se analizan sobre la base de correlaciones en lugar de covarianzas. (2)

Utilizar el método conocido como diagrama de violín, para mostrar la distribución y la densidad de probabilidad de los datos, mediante curvas de densidad. El ancho de cada curva corresponde con la frecuencia aproximada de los puntos de datos en cada región.

Para verificar la distribución de datos se procedió con la prueba de normalidad conocida como Shapiro–Wilk, la cual compara las puntuaciones de la muestra con un conjunto de puntuaciones normalmente distribuidas con la misma media y desviación estándar. Además, se aplicó la prueba Tukey (Tukey's honest significance test) como prueba de significancia y por último un análisis de correlación. Se utilizó el lenguaje de programación R mediante el entorno de RStudio para la transformación, manipulación y evaluación de los datos.

2.2.3 Generación y evaluación de modelos

Con los datos previamente transformados por el método de UV se procedió a construir dos diferentes modelos, el primero enfocado a la clasificación por tratamiento sin considerar la variedad, mientras que el segundo se enfocó en predecir la variedad sin importar el tratamiento al cual fueron sometidas las muestras. Los modelos se realizaron utilizando el paquete "caret" mediante la función "train" utilizando el método "rf" correspondiente a RF para procesar los datos. Se evaluó el desempeño del modelo basándose en su precisión, sensibilidad y especificidad de clasificación. Por último, se extrajeron los resultados concernientes a la importancia de cada una de las variables o metabolitos para así crear los gráficos de disminución de precisión promedio.

2.2.4 Jerarquización del contenido de metabolitos

Por último, mediante un análisis de conjuntos aplicado a los datos transformados de concentración de metabolitos se jerarquizaron las variedades afectadas por cada tratamiento de acuerdo con su aporte nutracéutico. Esta jerarquización se realizó agrupando tipos de metabolitos como: aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos y otros nutrientes. Las distancias entre puntos correspondieron a distancias euclidianas, mientras que el criterio de enlace entre los conjuntos fue el de agrupamiento de enlace promedio.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANÁLISIS EXPLORATORIO Y ESTADÍSTICO

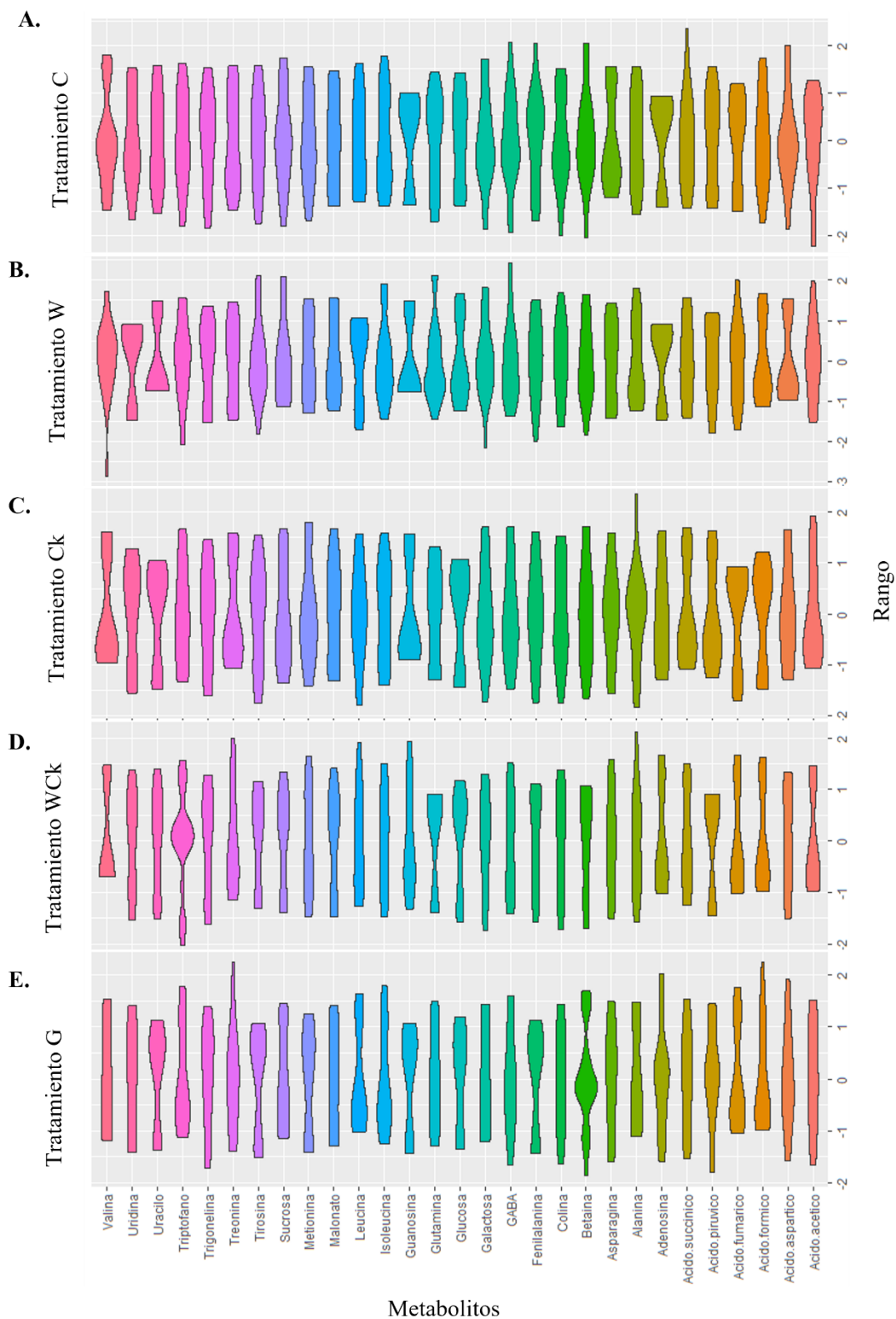
El punto de partida de este trabajo fue el análisis descriptivo de los datos (**Anexo 1**), los cuales corresponden a concentraciones de 29 metabolitos en mM de tres variedades distintas de quinua con seis replicas. Estas variedades son Chaucha (Cha), Tunkahuan (Tun) y Pata de Venado (Ven), cuyas semillas fueron sometidas a 4 tratamientos distintos más el control. El control identificado como C son semillas sin ningún tipo de procesamiento, el primer tratamiento (Ck) equivale a semillas sometidas a cocción, el segundo tratamiento (W) son semillas lavadas de modo similar al realizado antes de su consumo cotidiano, el tercer tratamiento (WCk) corresponde a semillas lavadas y cocinadas, mientras que el ultimo procesamiento de las semillas (G) fue la germinación

3.1.1 Visualización de los metabolitos

El conjunto de datos importados fue escalado mediante el método de UV con el objetivo de dar la misma importancia a cada uno de los metabolitos y poderlos visualizar conjuntamente. La figura 1 muestra la distribución de datos y su densidad de probabilidad según cada tratamiento mediante el diagrama de violín. En general se observa que en el tratamiento C contiene más metabolitos con una distribución normal mientras que a medida que se procesa la semilla los gráficos van mostrando perfiles de distribución más distintos al de una campana de Gauss. Estos diagramas nos indican una clara necesidad de evaluar la distribución de los datos antes de establecer alguna prueba de inferencia estadística válida.

Figura 1.

Diagramas de violín de los tratamientos C, W, Ck, WCk y G



3.1.2 Prueba de Normalidad

Con los datos originales se realizó la verificación de distribución con la prueba de normalidad Shapiro–Wilk. la cual nos indica si existe o no una diferencia significativa entre la distribución de los datos con una distribución continua simétrica, definida por la media y la desviación estándar de los datos. Como se observa en la tabla 1, los metabolitos que no se encuentran distribuidos normalmente en el tratamiento C son aquellos con p-valor inferior o igual a 0.05, y esto fueron: adenosina, asparagina, ácido fumárico y guanósina. A partir de este tratamiento, el número de metabolitos que no se distribuyen normalmente aumenta más del doble, teniendo al tratamiento W (tabla 2) con 11 metabolitos, seguido por el tratamiento Ck (tabla 3) con 12, después el tratamiento Wck (tabla 4) con 16 y finalmente G (tabla 5) con 16 metabolitos fuera de una distribución normal. Los metabolitos con mayor presencia en estas tablas fueron el ácido fórmico, ácido fumárico, la glucosa, guanósina y el uracilo. Mientras que los compuestos cuya distribución normal se mantuvo en todos los tratamientos fueron: colina y GABA.

Tabla 1.

Distribución del tratamiento de Control (C)

ID	Metabolito	p-valor
2	Adenosina	0.000093
4	Asparagina	0.004707
9	Ácido fumárico	0.015705
14	Guanósina	0.000216

Tabla 2.

Distribución del tratamiento de lavado (W)

ID	Metabolito	p-valor
2	Adenosina	0.000112
3	Alanina	0.049425
5	Ácido aspártico	0.000257
8	Ácido fórmico	0.007400
12	Glucosa	0.011052
14	Guanósina	0.000025
16	Leucina	0.012277
22	Sacarosa	0.049273
24	Trigonelina	0.044534
27	Uracilo	0.000021
28	Uridina	0.000153

Tabla 3.*Distribución del tratamiento de cocción (Ck)*

ID	Metabolito	p-valor
1	Ácido acético	0.010573
8	Ácido fórmico	0.002575
9	Ácido fumárico	0.000605
12	Glucosa	0.001051
13	Glutamina	0.011177
14	Guanosina	0.000260
20	Ácido pirúvico	0.012562
21	Ácido succínico	0.005553
23	Treonina	0.001815
27	Uracilo	0.000646
28	Uridina	0.035843
29	Valina	0.000190

Tabla 4.*Distribución del tratamiento de lavado y cocción (WCk)*

ID	Metabolito	p-valor
1	Ácido acético	0.000544
2	Adenosina	0.003207
6	Betaina	0.018445
8	Ácido fórmico	0.000915
9	Ácido fumárico	0.001498
12	Glucosa	0.000742
13	Glutamina	0.000075
17	Malonato	0.021894
19	Fenilalanina	0.024771
20	Ácido pirúvico	0.000065
21	Ácido succínico	0.020376
22	Sacarosa	0.005926
24	Trigonelina	0.042331
26	Tirosina	0.001655
27	Uracilo	0.037356
29	Valina	0.000011

Tabla 5.*Distribución del tratamiento germinación (G)*

ID	Metabolito	p-valor
3	Alanina	0.004904
8	Ácido fórmico	0.007075
9	Ácido fumárico	0.002347
11	Galactosa	0.012764

12	Glucosa	0.003314
14	Guanosina	0.000582
15	Isoleucina	0.023640
16	Leucina	0.001719
17	Malonato	0.027468
18	Metionina	0.006400
19	Fenilalanina	0.000923
22	Sacarosa	0.007259
25	Triptofano	0.013680
26	Tirosina	0.000718
27	Uracilo	0.000254
29	Valina	0.015362

3.1.3 Prueba de Pos – hoc o de significancia

Se aplicó la prueba HSD de Tukey ("diferencia honestamente significativa" o "diferencia significativa honesta") la cual es una herramienta estadística utilizada para determinar si la relación entre dos conjuntos de datos es estadísticamente significativa. Los resultados se agrupan según los niveles de factor, de modo que los datos que no comparten una letra poseen diferencias estadísticamente significativas entre medias. Como se observa en la tabla 6 para el tratamiento C, los metabolitos glucosa, malonato y trigonelina pertenecen a grupos estadísticos diferentes; del mismo modo para el tratamiento W (tabla 7) los metabolitos son asparagina, colina, malonato, ácido succínico y treonina; para el tratamiento Ck (tabla 8) los metabolitos que difieren en su agrupación son galactosa, malonato, sacarosa, trigonelina y triptófano; para el caso del tratamiento Wck mostrado en la tabla 9, son los metabolitos colina y guanosina; y por último, para el tratamiento G (tabla 10) los metabolitos GABA, glutamina, ácido succínico y uridina son los que pertenecen a grupos con diferencias significativas entre sus medias. Estas diferencias de agrupación evidencian que, la media de los datos reportados para los metabolitos previamente descritos, presentan diferencias estadísticamente significativas en cada una de las tres variedades (Tun, Ven y Cha).

Tabla 6.

Tukey reducida del tratamiento de control (C)

	Ac. Acético	Ac. Aspártico	Colina	Ac. fórmico	Glucosa	Glutamina	Malonato	Fenilalanina	Ac. succínico	Trigonelina	Triptófano	Tirosina	Valina
Tun	a	a	a	a	a	a	a	a	ab	a	a	a	a
Ven	a	b	b	b	b	a	b	a	a	b	b	a	b
Cha	b	ab	ab	b	c	b	c	b	b	c	a	b	a

Tabla 7.

Tukey reducida del tratamiento de lavado (W)

	Asparagina	Betaina	Colina	Ac. fumárico	GABA	Galactosa	Glutamina	Isoleucina	Malonato	Ac. succínico	Treonina	Triptófano	Tirosina
Tun	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Ven	b	b	b	b	a	ab	a	a	b	b	b	b	b
Cha	c	b	c	b	b	b	b	b	c	c	c	a	a

Tabla 8.

Tukey reducida del tratamiento de cocción (Ck)

	Adenosina	Alanina	Asparagina	Betaina	Colina	Galactosa	Malonato	Sacarosa	Trigonelina	Triptófano	Tirosina
Tun	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Ven	a	ab	ab	b	a	b	b	b	b	b	b
Cha	b	b	b	b	b	c	c	c	c	c	b

Tabla 9.

Tukey reducida del tratamiento de lavado y cocción (Wck)

	Alanina	Colina	Guanosina	Leucina	Treonina	Triptófano
Tun	a	a	a	a	a	a
Ven	b	b	b	ab	b	b
Cha	a	c	c	b	a	Ab

Tabla 10.

Tukey reducida del tratamiento de germinación (G)

	Adenosina	Betaina	Colina	GABA	Glutamina	Ac. Succínico	Treonina	Trigonelina	Uridina
Tun	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Ven	ab	b	a	b	b	b	b	b	b
Cha	b	b	b	c	c	c	b	a	c

3.1.4 Análisis de correlación

Para este análisis se consideraron los valores absolutos de las correlaciones por pares. Lo que significa que, si dos variables tienen una correlación alta, se analizó la correlación absoluta media de cada variable y se eliminó la variable con la correlación absoluta media más grande. El valor numérico para el límite de correlación absoluta por pares fue de 0.7.

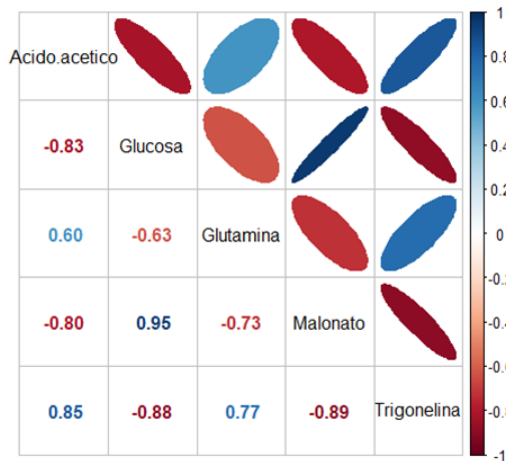
La figura 2 muestra la correlación entre metabolitos de los tratamientos C, W, Ck, Wck y G, donde se indica la magnitud y el signo de la tendencia entre los metabolitos. En la figura 2. correlación A, se muestra que glucosa-malonato y trigonelina-ácido acético tienen la mayor correlación directa, mientras que malonato-trigonelina y glucosa-trigonelina tienen la mayor correlación inversa en el tratamiento C. Para el caso del tratamiento W, mostrado en la figura 2. correlación B, los metabolitos asparagina-malonato y glutamina-malonato tienen la mayor correlación directa, mientras que asparagina-treonina y malonato-treonina, tienen la mayor correlación inversa. Así mismo para el tratamiento Ck de la figura 2. correlación C, los metabolitos sacarosa-triptófano y malonato-triptófano, tienen las

mayores correlaciones directa e inversa, respectivamente. En el tratamiento WCK mostrado en la figura 2. correlación D, se observa una única correlación directa entre los metabolitos guanosina y treonina. Por último, en el tratamiento G de la figura 2. correlación E, solamente glutamina-uridina tienen una fuerte correlación inversa, mientras que adenosina-uridina muestran una correlación directa poco marcada. Esto demuestra que ninguno de los metabolitos se correlaciona con otro, de forma similar en los distintos tratamientos.

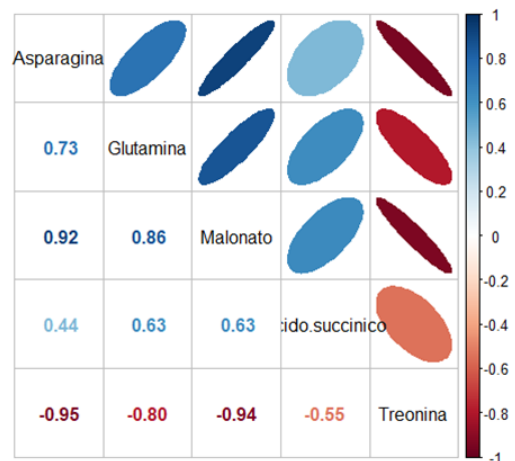
Figura 2.

Correlación de los metabolitos para cada tratamiento: C, W, Ck, WCK y G

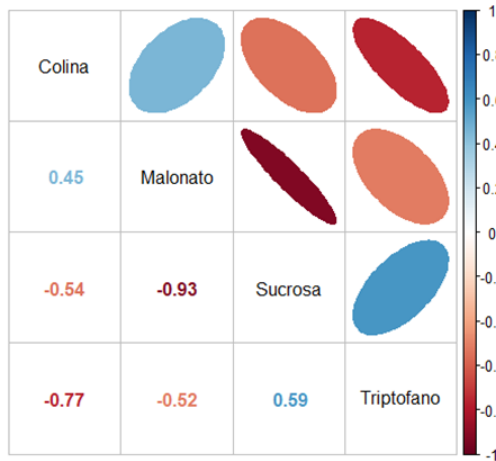
A. Tratamiento C



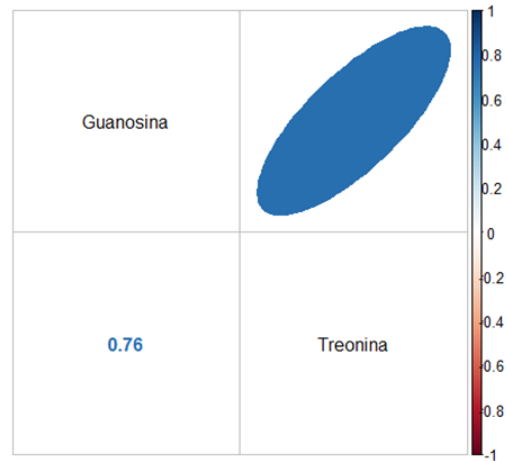
B. Tratamiento W



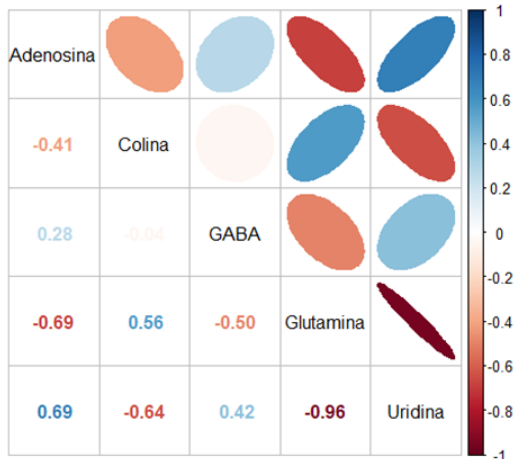
C. Tratamiento Ck



D. Tratamiento Wck



E. Tratamiento G



El cambio de distribución de metabolitos está directamente relacionado con los tratamientos aplicados a las semillas, por ejemplo, en el tratamiento de lavado las semillas absorben agua desencadenando una cascada de cambios metabólicos en donde se evidencian la respiración y síntesis proteica. Del mismo modo, en el

tratamiento de germinación existen varios procesos como absorción de agua y el inicio de actividad enzimática por lo que se utilizan las reservas para el crecimiento de embrión, esto genera que se consuman ciertos metabolitos provocando una alteración en la distribución normal metabólica (**Doria, 2010**).

En cuanto a la prueba de Tukey se observa que existen diferencias significativas en varios grupos de metabolitos en cada una de las tres variedades. **Vargas et al., (2019)** señala que la prueba de Tukey se usa cuando existe un panorama en donde las diferencias de los tamaños de muestra son grandes. Estas diferencias pueden deberse a que existe una gran variabilidad genética, ya que la planta se adapta a las diversas condiciones medioambientales en las que se desarrolla (**Rodríguez Gómez et al., 2021**). De la misma forma, en el análisis de correlación se evidencia que existen ciertos metabolitos que presentan correlación directa e inversa dependiendo del tipo de tratamiento, **Escuredo et al., (2014)**, realizaron análisis de tres genotipos de semillas comprobando que existe una alta correlación entre aminoácidos como prolina-alanina, isoleucina-valina, y tirosina-fenilalanina con coeficientes alrededor de 0,9.

3.2 GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE MODELOS

Para la generación de los modelos de clasificación con machine learning se utilizó el método Random Forest. Se construyeron dos grandes modelos, el primero considero como clase a la variedad de semillas de quinua sin considerar el tipo de tratamiento. El segundo modelo estuvo enfocado a predecir que tratamiento había recibido la semilla sin importar a que variedad correspondía. Para el tipo de datos utilizado en este trabajo este modelo fue muy eficaz a la hora de clasificar alcanzando una precisión de clasificación del 100%, especificidad y sensibilidad de 1 para ambos modelos. La importancia de cada uno de los metabolitos se extrajo de cada modelo y quedo representada en la figura 3 y figura 4

La evaluación individual de cada uno de los metabolitos durante el primer modelo se muestra en la figura 3. En esta figura se observa que el uracilo, ácido succínico, glucosa, guanosina, malonato, tirosina y trigonelina, presentan valores superiores al 4% de disminución de la precisión, lo que determina su principal relevancia sobre la precisión del modelo; mientras que, metionina, colina, ácido pirúvico, betaína y

ácido aspártico, son los metabolitos que intervienen en menor medida sobre la precisión, una afección menor al 2%.

La figura 4, muestra que tan importantes son cada uno de los metabolitos para el segundo modelo. Se evidencia que, ácido aspártico, alanina y valina, son los metabolitos que contribuyen en mayor medida a la precisión del modelo, ya que la ausencia de alguno de estos generaría una disminución de al menos 5% en la precisión del modelo. Por otra parte, guanosina, colina y metionina, son los metabolitos que menos influyen en la precisión de este. Con respecto al tipo de metabolitos que intervienen en la determinación de la precisión, se observa que entre aquellos que presentan valores superiores a 4, prevalecen los aminoácidos, siendo estos los de mayor importancia para el modelo. En contraste, entre los metabolitos que presentan valores de disminución de la precisión inferiores a 3, los más frecuentes son otros nutrientes.

Figura 3.

MDA variables

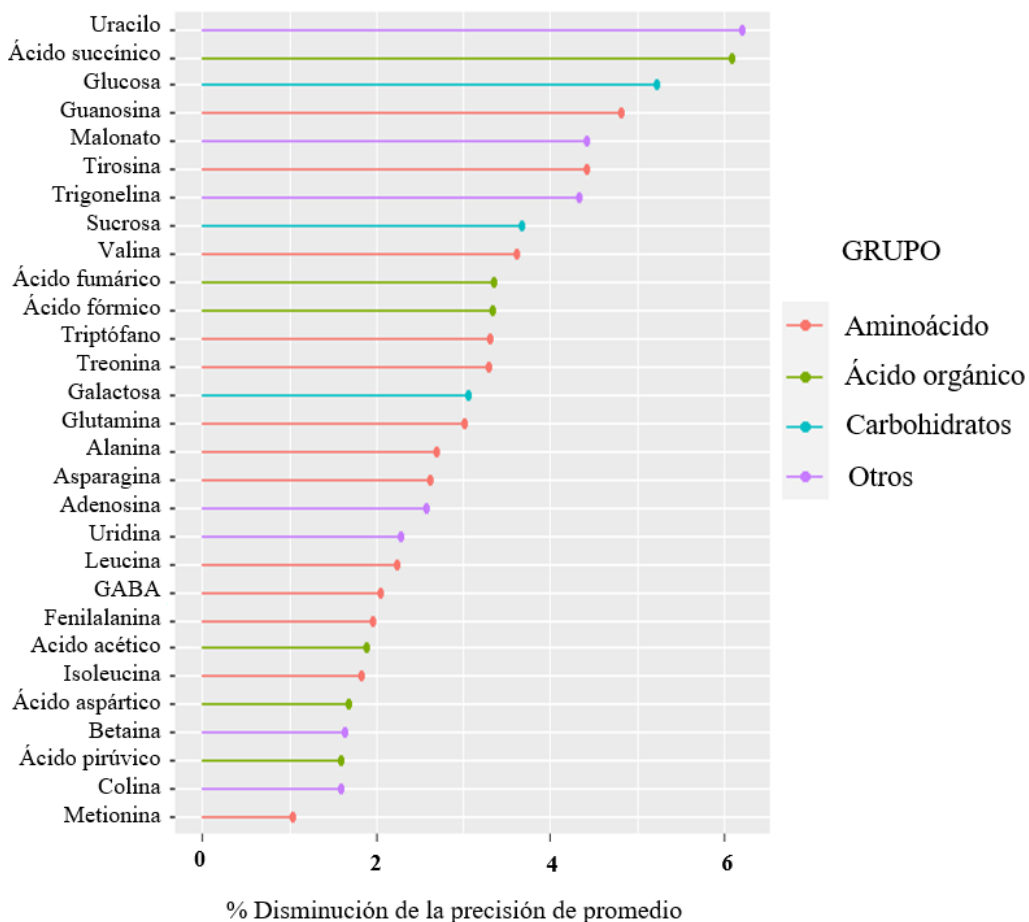
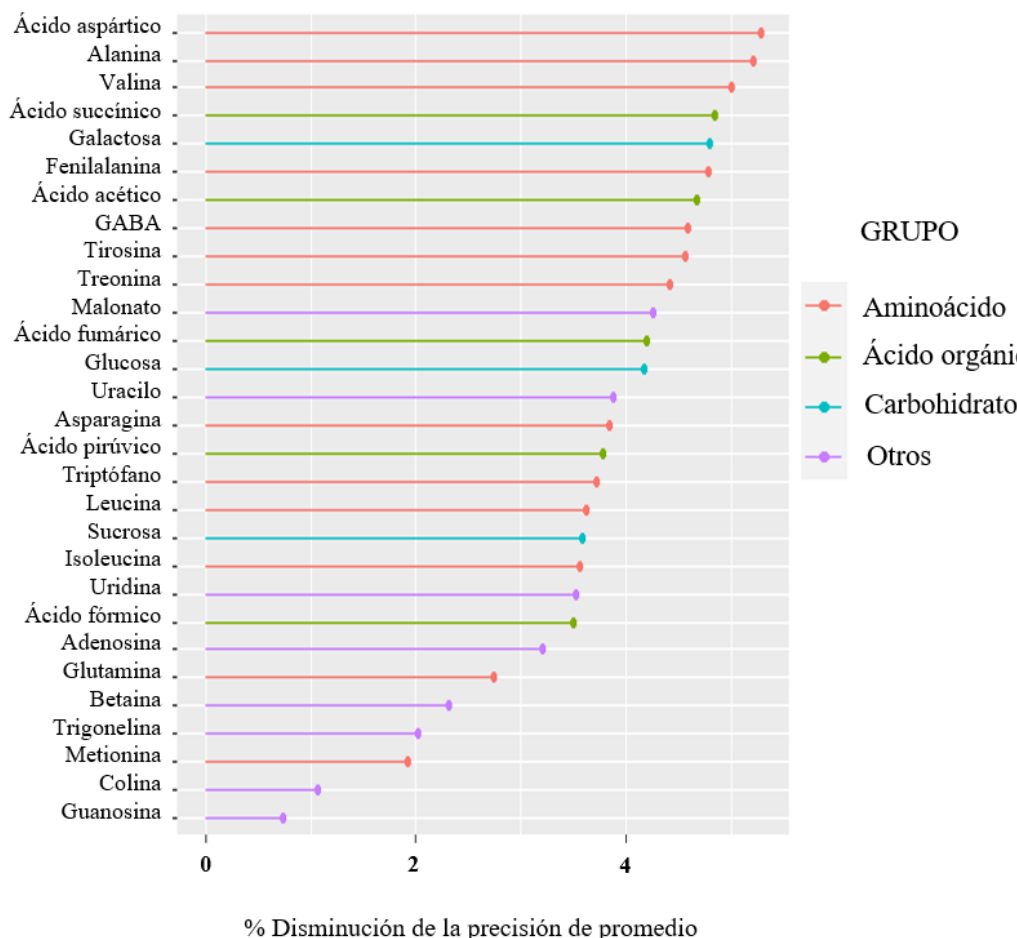


Figura 4.

MDA tratamientos



3.3. ANÁLISIS NUTRACEÚTICO

El perfil nutracéutico de todos los tratamientos y variedades fue determinado y desglosado en contenido de aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos y otros nutrientes.

3.3.1 Aminoácidos

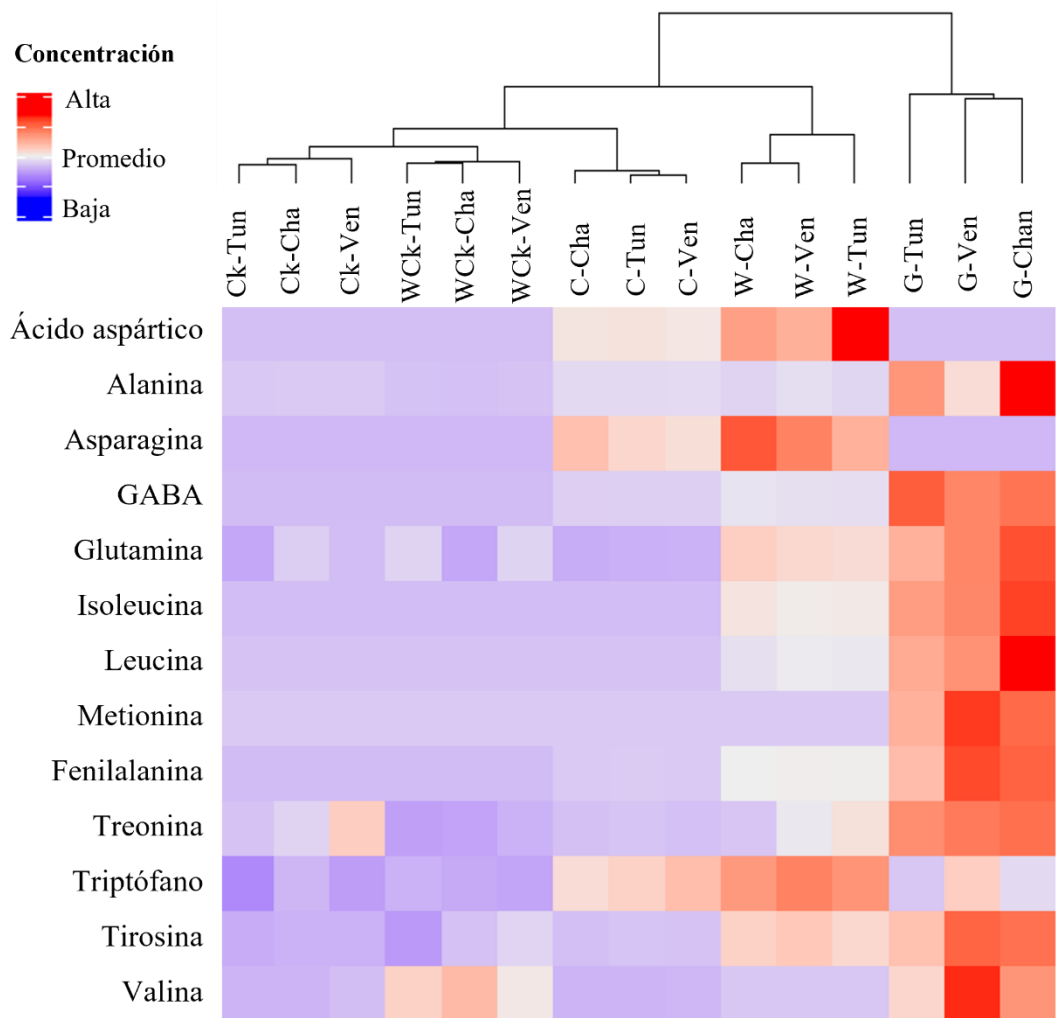
La figura 5, muestra que el tratamiento G en las tres variedades, es el que presenta el mayor contenido de aminoácidos, sobre todo en la variedad Chaucha con los aminoácidos alanina y leucina, mientras que, metionina y valina para Pata de venado; y GABA para Tunkahuan. Por otra parte, en el tratamiento W la mayor correlación se da con el ácido aspártico en sus tres variedades, especialmente con la Tunkahuan. Otros metabolitos de interés para W son asparagina y triptófano, mostrando una correlación directa relativamente reducida. En el caso del tratamiento C, existe una baja correlación tanto directa como inversa de los aminoácidos con respecto a las

variedades; la misma tendencia se observa en los tratamientos WCh y Ch, siendo en este último donde se evidencia un ligero incremento en la correlación inversa entre la actividad de los aminoácidos y las variedades.

Según **Escuredo et al., (2014)**, el perfil de aminoácidos de tres variedades de quinua cultivadas en Chillán (Chile) demostró que el ácido glutámico y la treonina presentaron la mayor concentración con valores de entre 6,47 a 8,79 (g/100g proteína), seguido de ácido aspártico, glicina y arginina que exhibieron valores superiores a 3 g/100g. Asimismo, otros aminoácidos de interés fueron alanina y leucina con valores superiores a 2 g/100g proteína. Cabe recalcar que en este estudio las semillas no fueron sometidas a ningún tipo de tratamiento y que los valores medios de concentración de aminoácidos no difirieron por genotipo. Esto concuerda con el presente estudio en donde se evidencia que la treonina, leucina y alanina también presentan elevada actividad metabólica, sobre todo en el tratamiento de germinación. Por otra parte, valina, metionina, asparagina e isoleucina muestran mayor actividad metabólica a comparación de la reportada por **Escuredo et al., (2014)**. Esta variabilidad puede deberse a los distintos genotipos de las variedades analizadas, a la madurez de la planta, a las condiciones de cultivo y especialmente a los tratamientos (**Zhang et al., 2018**).

Figura 5.

Heatmap aminoácidos



3.3.2 Ácidos orgánicos

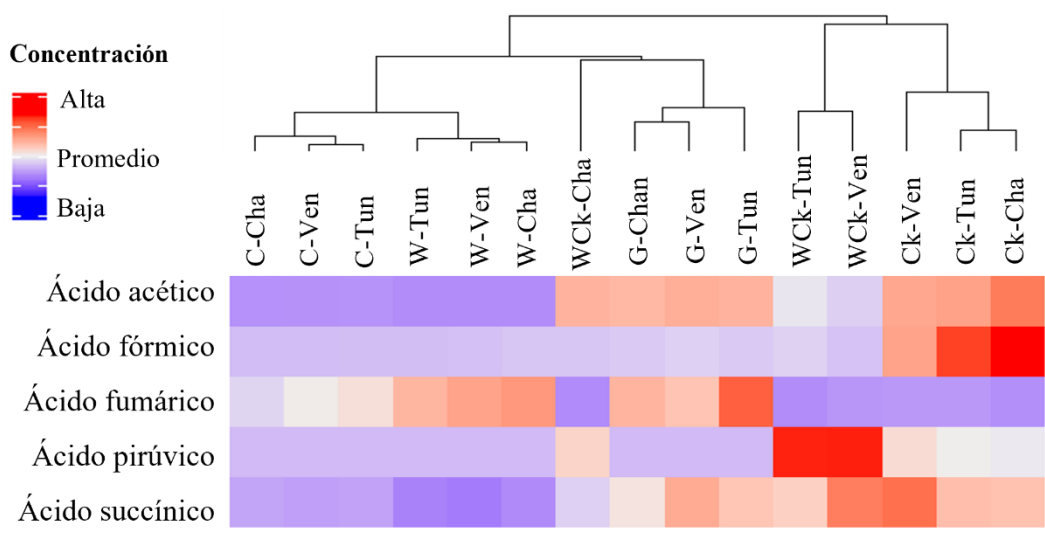
En cuanto a los ácidos orgánicos, la figura 6, se refiere a su correlación con respecto al tratamiento-variedad. Es así como el ácido acético muestra una correlación directa en todas las variedades del tratamiento Ck, en las tres variedades del tratamiento G y en la variedad Chaucha del tratamiento Wck; mientras que para las tres variedades de los tratamientos C y W, su correlación es inversa. En el caso del ácido aspártico, se evidencia que su mayor correlación directa es con la variedad Tunkaguan en el tratamiento W y en menor grado con las variedades Pata de Venado y Chaucha del mismo tratamiento, para el resto de las variedades y tratamientos no se observa una correlación marcada. En cuanto al ácido fórmico, la correlación directa más importante es con el tratamiento Ck, siendo esta mayor en las variedades Tun y Cha, sin embargo, en los demás tratamientos y variedades la correlación se muestra ligeramente inversa. Para el caso del ácido fumárico, esta muestra una correlación directa para las tres variedades del tratamiento G, siendo más fuerte en la variedad

Tun, y en las tres variedades del tratamiento W; no obstante, se observa una correlación inversa para las tres variedades de los tratamientos Ck y W. Con respecto al ácido pirúvico, se identifica que su principal correlación directa es con las variedades Tun y Ven del tratamiento W, mostrando además que no existe correlación con el resto de tratamientos y sus respectivas variedades.

Estudios previos realizados por **Pellegrini et al., (2018)** y **Pereira et al., (2019)**, habían determinado cinco ácidos orgánicos en la composición química de la quinua, siendo estos: ácido oxálico (0,55 a 1,1 mg/g), cítrico (0,41 a 0,79 mg/g), fumárico (0,02 a 0,09 mg/g), málico (1,14 a 5,39 mg/g) y succínico (12,16 a 17,3 mg/g). Sin embargo, recientemente la investigación de **Song et al., (2020)**, ha reportado también la presencia de otros 12 ácidos orgánicos adicionales, incluyendo el ácido pirúvico (0,13 a 0,14 mg/g). La presente investigación coincide en el registro de los ácidos: succínico en los tratamientos Ck y Wck de la variedad Pata de venado; fumárico en el tratamiento G de la variedad Tunkahuan; y pirúvico en el tratamiento Wck de las variedades Tunkahuan y Pata de venado. Existe escasa información de estudios más amplios en cuanto a metabolómica en *C. quinoa*, tal es el caso para el ácido acético y fórmico, siendo **Lalaleo, (2020)** los primeros en reportar estos metabolitos.

Figura 6.

Heatmap ácidos orgánicos



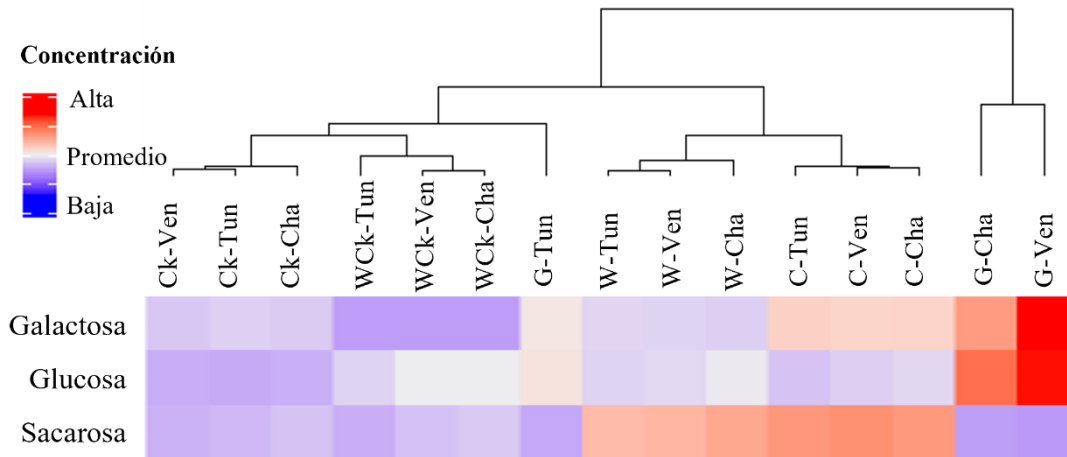
3.3.3 Carbohidratos

En cuanto a los hidratos de carbono, la figura 7, destaca su correlación existente con el tratamiento-variedad. La galactosa presenta una alta correlación directa con el tratamiento G en sus variedades Ven y Cha, y una correlación inversa con el tratamiento Wck en todas sus variedades; sin embargo, para el resto de los tratamientos y sus correspondientes variedades, no parece existir correlaciones importantes. En cuanto a la glucosa, su correlación directa más importante es con el tratamiento G en las variedades Ven y Cha, mientras que los demás tratamientos no evidencian correlaciones de interés. Por su parte, la sacarosa presenta correlación directa con los tratamientos C y W, e inversa con los tratamientos G, Wck y Ck; no obstante, todas son bajas.

De acuerdo con lo indicado por **Vega et al., (2010)**, el mayor constituyente de las semillas de quinua es el almidón, mientras que los azúcares se encuentran en cantidades mucho menores, resultando en un índice glicémico relativamente bajo. En este mismo estudio se establecen contenidos de 1,7 mg de glucosa; 0,2 mg de fructosa; 2,9 mg de sacarosa y 1,4 mg de maltosa. Todos estos valores obtenidos por cada 100 g de muestra, correspondiente a harina de quinua. Por su parte, **Ogungbenle, (2019)**, al realizar la evaluación nutricional también de harina de quinua, encontró que los principales azúcares fueron la D-xilosa con hasta 120 mg/100g de muestra y D-galactosa con 61mg/100g de muestra, así mismo señala que el contenido de glucosa y fructosa fueron los más bajos. De acuerdo con lo previamente descrito, existen contenidos de azúcares diferentes según la variedad de quinua analizada; sin embargo, los estudios coinciden en la presencia de galactosa, glucosa y sacarosa, tal y como se evidencia en la presente investigación. Galactosa y glucosa prevalecen en las variedades Chaucha y Pata de venado del tratamiento (G), mientras que la sacarosa tiene una mayor actividad en las tres variedades del tratamiento (C).

Figura 7.

Heatmap carbohidratos



3.3.4 Otros nutrientes

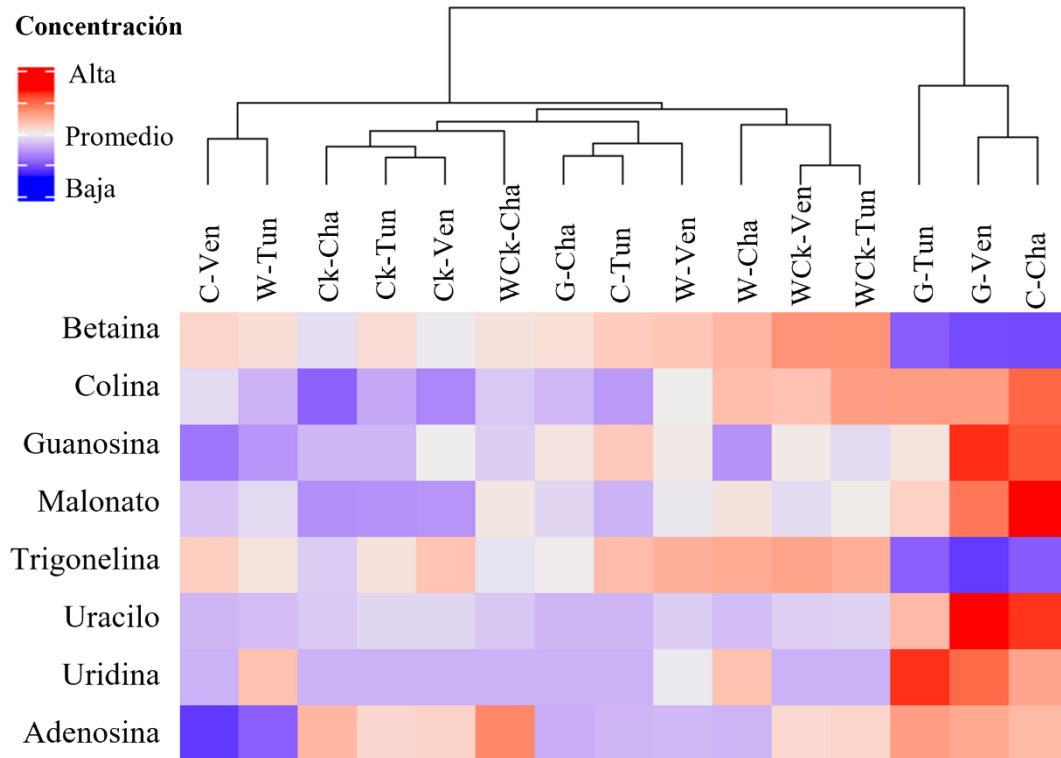
En la figura 8, se observa que el tratamiento G en todas sus variedades presenta una importante correlación directa con los nutrientes colina, guanósina, malonato, uracilo, uridina y adenosina, mientras que con betaína y trigonelina esta correlación es inversa. Otras correlaciones inversas relevantes se identifican con colina en el tratamiento Ck, variedad Cha y en adenosina en los tratamientos C, variedad Ven y tratamiento W, variedad Tun. Para los demás tratamientos y sus respectivas variedades, las correlaciones identificadas tanto directas como inversas son de menor interés

Según **Curti et al., (2016)**, la betaína y su precursor la colina, son nutrientes que se encuentran presentes en la quinua con una concentración de 3,93 a 6 mg/ 100 g. En cuanto a la trigonelina **Nuñez, (2018)**, ha reportado la presencia de este metabolito, pero únicamente como trazas. La presente investigación concuerda con los datos hallados por dichos autores ya que, la betaína y la colina presentan baja correlación en cuanto a actividad metabólica en todos los tratamientos. Asimismo, la trigonelina exhibe una disminuida correlación entre tratamientos y variedades. La producción de estos metabolitos en la planta incrementa cuando existe un mayor estrés, especialmente para protegerse contra los daños irreparables que se generan por la alta salinidad del suelo (**Nuñez, 2018**).

Figura 8.

Heatmap otros nutrientes

Concentración



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

4.1 Conclusiones

El presente trabajo demostró que es posible identificar diferencias cuantitativas de distintos tratamientos aplicados a semillas de quinoa. A su vez que es posible utilizar estas diferencias para discriminar entre variedades y tratamientos.

La influencia de estos tratamientos quedo evidenciada al comparar los distintos perfiles nutracéuticos y metabolómicos de cada variedad y tratamiento.

La aplicación de análisis multivariantes y de machine learning permitió la interpretación y visualización de los resultados, lo cual condujo a la caracterización de procesamientos de semillas, facilitando una toma de decisión al consumidor o productores de semillas para consumo.

El análisis exploratorio de grupos de datos provenientes de distintos cultivares de quinua permitió identificar los metabolitos distribuidos normalmente en el grupo control y en los que se aplicaron algún tipo de tratamiento. La asparagina es el único metabolito que después de cualquier tratamiento se distribuye de forma normal en la composición fitoquímica de las muestras. Por otro lado, la glucosa pierde su distribución normal cuando se emplean cualquier tratamiento de estudio. Se evidenció que ciertos metabolitos presentan correlación tanto directa como inversa entre sí en los diferentes tratamientos y en el control.

La discriminación entre el tipo de procesamiento de la semilla y cultivar se realizó mediante Random Forest. Al analizar a la variedad como variable de importancia se determinó que principalmente guanosina, tirosina, uracilo y ácido succínico son los de mayor relevancia para evaluar la precisión del modelo. Por otra parte, cuando los tratamientos son la variable de importancia se evidenció que los aminoácidos son los metabolitos que contribuyen en mayor medida a la precisión de dicho modelo, en cambio, los que menor influencia tienen son los considerados otros nutrientes.

Se realizó satisfactoriamente la jerarquización del aporte nutracéutico de los cultivares de quinua, de manera que, este análisis permitió una mejor interpretación de manera general de aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos y otros nutrientes. En cuanto a los aminoácidos se identificó que el tratamiento de

germinación (G) es el que presentó mayor actividad metabólica en las tres variedades. En lo que respecta a ácidos orgánicos, el ácido fórmico y pirúvico son los que muestran mayor correlación directa con los tratamientos (ck) y (wck) respectivamente. En el caso de los carbohidratos el tratamiento (G) es el que mayor correlación directa exhibió con el metabolito galactosa en las variedades Ven y Cha. Finalmente, el tratamiento (G) es el que obtuvo mayor correlación directa en todas sus variedades con varios metabolitos en el grupo de “otros nutrientes”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angeli, V., Silva, P. M., Massuela, D. C., Khan, M. W., Hamar, A., Khajehei, F., Graeff-Hönninger, S., & Piatti, C. (2020). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): An overview of the potentials of the “golden grain” and socio-economic and environmental aspects of its cultivation and marketization. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/foods9020216>
- Antognoni, F., Potente, G., Biondi, S., Mandrioli, R., Marincich, L., & Ruiz, K. B. (2021). Free and conjugated phenolic profiles and antioxidant activity in quinoa seeds and their relationship with genotype and environment. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/plants10061046>
- Carciochi, R. A., Manrique, G. D., & Dimitrov, K. (2014). Changes in phenolic composition and antioxidant activity during germination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Food Research Journal*, 21(2).
- Contreras, B., Torres, O. L., & Rodríguez, M. E. (2019). Physicochemical characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and isolated starch. *Food Chemistry*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124982>
- Cuperlovic, M. (2018). Machine learning methods for analysis of metabolic data and metabolic pathway modeling. In *Metabolites* (Vol. 8, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo8010004>
- Curti, C. A., Rivas, M., & Villalva, F. J. (2016). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) y su rol en la prevención de ECNT. *Instituto de Investigaciones Para La Industria Química, CONICET*.
- Doria, J. (2010). Revisión bibliográfica Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74–85.
- Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. In *Metabolites* (Vol. 9, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
- Escuredo, O., González, M., Wells, G., Fischer, S., & Hernández, J. (2014). Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using near infrared

spectroscopy and chemometric techniques. *Journal of Cereal Science*, 67-74.
Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.01.016>

Ferrer, D. C. (2019). *Avances en el Estudio de Matrices Alimentarias mediante RMN Metabólica*. Universidad Complutense de Madrid.

Ghosh, T., Zhang, W., Ghosh, D., & Kechris, K. (2020). Predictive Modeling for Metabolomics Data. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2104, pp. 313–336). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_16

Hernández, B. (2019). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as a source of nutrients and bioactive compounds: A review. In *Bioactive Compounds in Health and Disease* (Vol. 2, Issue 3, pp. 27–47). Functional Food Institute. <https://doi.org/10.31989/bchd.v2i3.556>

Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. In *Nature Protocols* (Vol. 5, Issue 3, pp. 536–549). <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.237>

Kim, S. L., Kim, S. K., & Park, C. H. (2004). Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable. *Food Research International*, 37(4), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.12.008>

Lalaleo, L., Hidalgo, D., Valle, M., Calero-Cáceres, W., Lamuela-Raventós, R. M., & Becerra-Martínez, E. (2020). Differentiating, evaluating, and classifying three quinoa ecotypes by washing, cooking and germination treatments, using 1H NMR-based metabolomic approach. *Food Chemistry*, 331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127351>

Lin, M., Han, P., Li, Y., Wang, W., Lai, D., & Zhou, L. (2019). Quinoa secondary metabolites and their biological activities or functions. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24132512>

Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., & Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 43, pp. 34–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>

- McBride, L., Barrett, C. B., Browne, C., Hu, L., Liu, Y., Matteson, D. S., Sun, Y., & Wen, J. (2021). Predicting poverty and malnutrition for targeting, mapping, monitoring, and early warning. *Applied Economic Perspectives and Policy*. <https://doi.org/10.1002/aepp.13175>
- Megat, M. R., & Azrina, A. (2017). Effect of germination on total phenolic, tannin and phytic acid contents in soy bean and peanut. In *International Food Research Journal* (Vol. 19, Issue 2).
- Mhada, M., Metougui, M. L., el Hazzam, K., el Kacimi, K., & Yasri, A. (2020). Variations of saponins, minerals and total phenolic compounds due to processing and cooking of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Foods*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/foods9050660>
- Mora, M. S., Morillo, A. C., & Manjarres, E. H. (2022). Extraction and Quantification of Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Genotypes from Colombia. *International Journal of Food Science*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7287487>
- Nuñez, N. (2018). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) Alternativa de seguridad alimentaria para zonas desérticas. *Ciencia y Desarrollo*(19). Obtenido de <https://doi.org/10.33326/26176033.2018.19.472>
- Ogungbenle, H. (2019). Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 153-158. Obtenido de: <http://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080/0963748031000084106>
- Organización de las Naciones Unidas. (2015). *Objetivos de Desarrollo Sostenible*.
- O'Shea, K., & Misra, B. B. (2020). Software tools, databases and resources in metabolomics: updates from 2018 to 2019. In *Metabolomics* (Vol. 16, Issue 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01657-3>
- Pellegrini, M., Lucas, R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández, J., Pérez, J., & Viuda, M. (2018). Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (*Chenopodium quinoa*

- Willd) seeds. *Industrial Crops & Products*, 38-46. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10261/192161>
- Pereira, E., Encina, C., Barros, L., Gonzales, U., Cadavez, V., & Ferreira, I. (2019). Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food Chemistry*, 110-114. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.068
- Pomyen, Y., Wanichthanarak, K., Pongsombat, P., Fahrman, J., Grapov, D., & Khoomrung, S. (2020). Deep metabolome: Applications of deep learning in metabolomics. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 18, pp. 2818–2825). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.033>
- Rodríguez Gómez, M. J., Matías Prieto, J., Cruz Sobrado, V., & Calvo Magro, P. (2021). Nutritional characterization of six quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) varieties cultivated in Southern Europe. *Journal of Food Composition and Analysis*, 99, 103876. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2021.103876>
- Song, J., Yan, Y., Wang, X., Li, X., Chen, Y., & Li, W. (2020). Characterization of fatty acids, amino acids and organic acids in three colored quinoas based on untargeted and targeted metabolomics. *LWT - Food Science and Technology*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110690>
- Tabatabaei, I., Alseekh, S., Shahid, M., Leniak, E., Wagner, M., Mahmoudi, H., Thushar, S., Fernie, A. R., Murphy, K. M., Schmöckel, S. M., Tester, M., Mueller-Roeber, B., Skirycz, A., & Balazadeh, S. (2022). The diversity of quinoa morphological traits and seed metabolic composition. *Scientific Data*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01399-y>
- Tumpaung, R., Thobunluepop, P., Kongsil, P., Onwimol, D., Lertmongkol, S., Sarobol, E., Chitbanchong, W., & Pawelzik, E. (2021). Comparison of grain processing techniques on saponin content and nutritional value of quinoa (*Chenopodium quinoa* cv. yellow pang-da) grain. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 24(7), 821–829. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.821.829>

- Vargas, A., Valerio, E., Salazar, J., García, S., Alvarado, R., & Volumen, B. (2019). “Una nueva propuesta para el aprendizaje” *Serengueti Revista de Estadística. Serengueti*, 1(2).
- Varmuza, K., & Filzmoser, P. (2009). *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics* (1ª edición). Prensa CRC. <https://doi.org/10.1201/9781420059496>
- Vega, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*), an ancient Andean grain: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2541-2547. doi:10.1002/jsfa.4158
- Wishart, D. S. (2019). NMR metabolomics: A look ahead. In *Journal of Magnetic Resonance* (Vol. 306, pp. 155–161). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.013>
- Zhang, B., Rong, Z., Shi, Y., Wu, J., & Shi, C. (2018). Prediction of the amino acid composition in brown rice using different sample status by near-infrared reflectance spectroscopy. *Food Chemistry*, 275-281. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.110>

ANEXOS

ANEXO 1: Metabolitos

Tabla 11.

Metabolitos

Tratamiento	Variedad	Ácido acético	Adenosina	Alanina	Asparagina
C	Cha	0.082368	0.003956	0.183448	0.014744
C	Cha	0.07904	0.004257	0.177466	0.014592
C	Cha	0.077376	0.003913	0.16949	0.015048
C	Cha	0.072384	0.003784	0.185442	0.01368
C	Cha	0.07072	0.003655	0.197406	0.014744
C	Cha	0.079872	0.003956	0.175472	0.01444
C	Tun	0.086217	0.00432	0.174236	0.010527
C	Tun	0.090181	0.003915	0.190444	0.011011
C	Tun	0.087208	0.00414	0.200574	0.010648
C	Tun	0.088199	0.00396	0.178288	0.011858
C	Tun	0.086217	0.004275	0.18234	0.011132
C	Tun	0.088199	0.004005	0.19247	0.010527
C	Ven	0.086848	0.001344	0.19344	0.009951
C	Ven	0.088736	0.001274	0.199485	0.009202
C	Ven	0.083072	0.001232	0.195455	0.009951
C	Ven	0.081184	0.001372	0.171275	0.010058
C	Ven	0.086848	0.001204	0.17732	0.009523
C	Ven	0.082128	0.001246	0.18941	0.009951
Ck	Cha	1.807077	0.007326	0.12141	0.000091
Ck	Cha	1.848619	0.006956	0.130853	0.000098
Ck	Cha	1.765535	0.007252	0.118712	0.000099
Ck	Cha	2.014787	0.006438	0.12141	0.000099
Ck	Cha	1.890161	0.006882	0.118712	0.00009
Ck	Cha	2.014787	0.007326	0.118712	0.000095
Ck	Tun	1.491017	0.006138	0.118825	0.000085
Ck	Tun	1.457511	0.00627	0.113925	0.000093
Ck	Tun	1.625041	0.006402	0.1127	0.000088
Ck	Tun	1.574782	0.006006	0.109025	0.000085
Ck	Tun	1.574782	0.005742	0.11025	0.000091
Ck	Tun	1.591535	0.00594	0.118825	0.000093
Ck	Ven	1.47618	0.006664	0.124806	0.000094
Ck	Ven	1.55819	0.005848	0.11407	0.000095
Ck	Ven	1.443376	0.005848	0.118096	0.000085
Ck	Ven	1.541788	0.006528	0.12078	0.000093
Ck	Ven	1.47618	0.006596	0.12078	0.000092
Ck	Ven	1.47618	0.00578	0.122122	0.000089
W	Cha	0.042042	0.004185	0.152337	0.028884
W	Cha	0.044352	0.004365	0.162843	0.028884

W	Cha	0.043428	0.00405	0.166345	0.029548
W	Cha	0.03927	0.00396	0.155839	0.031208
W	Cha	0.042504	0.00387	0.154088	0.030212
W	Cha	0.042042	0.00414	0.162843	0.028552
W	Tun	0.045756	0.002134	0.161078	0.015834
W	Tun	0.04182	0.002002	0.159205	0.016016
W	Tun	0.04428	0.00209	0.170443	0.017472
W	Tun	0.042804	0.002178	0.185427	0.018018
W	Tun	0.04674	0.002046	0.161078	0.01638
W	Tun	0.042804	0.002178	0.181681	0.017836
W	Ven	0.039585	0.003995	0.20205	0.025641
W	Ven	0.04277	0.004324	0.21103	0.025641
W	Ven	0.040495	0.004136	0.190825	0.024087
W	Ven	0.039585	0.00423	0.20205	0.022792
W	Ven	0.04459	0.004183	0.190825	0.02331
W	Ven	0.040495	0.004277	0.199805	0.022533
Wck	Cha	1.41189	0.00801	0.083168	0.000092
Wck	Cha	1.382166	0.008366	0.084072	0.000093
Wck	Cha	1.426752	0.008633	0.08588	0.000087
Wck	Cha	1.397028	0.008455	0.08588	0.000094
Wck	Cha	1.307856	0.007921	0.078648	0.000099
Wck	Cha	1.397028	0.008188	0.08136	0.000097
Wck	Tun	0.74474	0.006499	0.081958	0.000088
Wck	Tun	0.704265	0.005896	0.083864	0.000086
Wck	Tun	0.752835	0.00603	0.091488	0.000098
Wck	Tun	0.76093	0.006566	0.094347	0.000092
Wck	Tun	0.79331	0.005896	0.087676	0.000096
Wck	Tun	0.71236	0.00603	0.093394	0.000088
Wck	Ven	0.57779	0.005695	0.093984	0.000086
Wck	Ven	0.571708	0.006499	0.092928	0.000085
Wck	Ven	0.596036	0.005762	0.090816	0.000098
Wck	Ven	0.54738	0.006432	0.099264	0.000091
Wck	Ven	0.54738	0.005695	0.09504	0.000091
Wck	Ven	0.589954	0.006164	0.103488	0.000093
G	Cha	1.38947	0.007425	1.297593	0.000086
G	Cha	1.272462	0.00675	1.17963	0.000093
G	Cha	1.31634	0.007125	1.205844	0.000094
G	Cha	1.374844	0.0066	1.17963	0.000092
G	Cha	1.31634	0.00675	1.258272	0.000096
G	Cha	1.38947	0.0069	1.218951	0.000088
G	Tun	1.309704	0.00748	0.662405	0.000097
G	Tun	1.458534	0.008245	0.693577	0.000085
G	Tun	1.458534	0.007395	0.732542	0.000091
G	Tun	1.428768	0.007565	0.685784	0.000089
G	Tun	1.384119	0.00731	0.709163	0.000093
G	Tun	1.279938	0.008075	0.662405	0.000096
G	Ven	1.463768	0.00738	0.373824	0.000086

G	Ven	1.354764	0.00738	0.347392	0.00009
G	Ven	1.370336	0.007462	0.347392	0.000093
G	Ven	1.494912	0.007954	0.347392	0.000096
G	Ven	1.448196	0.007134	0.35872	0.000091
G	Ven	1.47934	0.00697	0.351168	0.000086

Tratamiento	Variedad	Ácido aspártico	Betaina	Colina	Ácido fórmico
C	Cha	0.01251	1.604967	0.151641	0.010752
C	Cha	0.013205	1.499145	0.170814	0.010976
C	Cha	0.012371	1.604967	0.153384	0.010192
C	Cha	0.013483	1.640241	0.162099	0.010528
C	Cha	0.013761	1.675515	0.155127	0.00952
C	Cha	0.012649	1.622604	0.15687	0.01008
C	Tun	0.014751	1.726998	0.14508	0.012183
C	Tun	0.014602	1.651086	0.138632	0.011135
C	Tun	0.012814	1.70802	0.154752	0.011266
C	Tun	0.012963	1.670064	0.154752	0.011659
C	Tun	0.012963	1.70802	0.151528	0.011921
C	Tun	0.014006	1.80291	0.156364	0.012052
C	Ven	0.011438	1.820412	0.168384	0.010208
C	Ven	0.012236	1.618144	0.171892	0.011368
C	Ven	0.013167	1.618144	0.171892	0.010788
C	Ven	0.013034	1.56298	0.173646	0.010208
C	Ven	0.01197	1.710084	0.152598	0.010672
C	Ven	0.012901	1.65492	0.16663	0.009976
Ck	Cha	0.000086	1.346145	0.13968	0.316448
Ck	Cha	0.000095	1.409493	0.13095	0.32364
Ck	Cha	0.000099	1.377819	0.126585	0.34162
Ck	Cha	0.000088	1.520352	0.13968	0.348812
Ck	Cha	0.000089	1.457004	0.132405	0.312852
Ck	Cha	0.000091	1.488678	0.138225	0.316448
Ck	Tun	0.000085	1.689159	0.158662	0.286491
Ck	Tun	0.000099	1.670996	0.155424	0.318681
Ck	Tun	0.00009	1.562018	0.160281	0.283272
Ck	Tun	0.000095	1.670996	0.157043	0.315462
Ck	Tun	0.000092	1.598344	0.152186	0.280053
Ck	Tun	0.000091	1.543855	0.142472	0.296148
Ck	Ven	0.000085	1.567262	0.154737	0.185808
Ck	Ven	0.000091	1.433878	0.137544	0.172536
Ck	Ven	0.000085	1.417205	0.145359	0.178224
Ck	Ven	0.000088	1.567262	0.151611	0.168744
Ck	Ven	0.000099	1.50057	0.135981	0.187704
Ck	Ven	0.000093	1.450551	0.143796	0.182016
W	Cha	0.03168	1.74798	0.201312	0.01904
W	Cha	0.032384	1.922778	0.184536	0.019488
W	Cha	0.030624	1.65087	0.180342	0.021952

W	Cha	0.030272	1.922778	0.192924	0.021504
W	Cha	0.03168	1.883934	0.184536	0.020608
W	Cha	0.030624	1.864512	0.195021	0.020384
W	Tun	0.059682	1.597212	0.165984	0.011656
W	Tun	0.057855	1.510407	0.160797	0.012028
W	Tun	0.056637	1.684017	0.146965	0.01178
W	Tun	0.054201	1.597212	0.169442	0.011036
W	Tun	0.057855	1.649295	0.148694	0.01178
W	Tun	0.056637	1.649295	0.148694	0.011656
W	Ven	0.028421	1.763838	0.163572	0.014949
W	Ven	0.025198	1.763838	0.176886	0.014043
W	Ven	0.029007	1.669008	0.176886	0.014194
W	Ven	0.025198	1.782804	0.174984	0.014345
W	Ven	0.027542	1.80177	0.16167	0.013741
W	Ven	0.028714	1.669008	0.188298	0.013137
WcK	Cha	0.000099	1.631558	0.16454	0.020874
WcK	Cha	0.000098	1.683629	0.161076	0.019383
WcK	Cha	0.000091	1.527416	0.154148	0.020661
WcK	Cha	0.000098	1.527416	0.166272	0.021087
WcK	Cha	0.000089	1.492702	0.166272	0.018531
WcK	Cha	0.000098	1.718343	0.16454	0.01917
WcK	Tun	0.000087	2.108004	0.196648	0.03591
WcK	Tun	0.000086	1.868952	0.205016	0.03402
WcK	Tun	0.000098	1.912416	0.207108	0.035154
WcK	Tun	0.00009	2.129736	0.202924	0.034398
WcK	Tun	0.000097	2.06454	0.19874	0.03213
WcK	Tun	0.000085	2.129736	0.18828	0.037044
WcK	Ven	0.000085	2.136717	0.200832	0.017472
WcK	Ven	0.000096	2.115134	0.192464	0.016016
WcK	Ven	0.000092	2.071968	0.190372	0.016562
WcK	Ven	0.000093	1.94247	0.182004	0.018018
WcK	Ven	0.000089	2.028802	0.184096	0.017108
WcK	Ven	0.000093	1.899304	0.17782	0.015834
G	Cha	0.000097	0.699438	0.211302	0.029008
G	Cha	0.000089	0.756369	0.218268	0.02516
G	Cha	0.000091	0.780768	0.222912	0.026048
G	Cha	0.000092	0.707571	0.222912	0.02664
G	Cha	0.000088	0.756369	0.19737	0.025752
G	Cha	0.000092	0.699438	0.222912	0.02516
G	Tun	0.00009	0.856716	0.207072	0.025944
G	Tun	0.000085	0.751812	0.196287	0.027354
G	Tun	0.00009	0.839232	0.211386	0.026226
G	Tun	0.000097	0.839232	0.185502	0.027354
G	Tun	0.000094	0.847974	0.187659	0.026508
G	Tun	0.000094	0.78678	0.213543	0.026508
G	Ven	0.000094	0.763092	0.20025	0.037026
G	Ven	0.000089	0.755384	0.2047	0.034408

G	Ven	0.000085	0.662888	0.20025	0.03366
G	Ven	0.000099	0.747676	0.19135	0.03179
G	Ven	0.00009	0.747676	0.211375	0.032164
G	Ven	0.000087	0.755384	0.193575	0.03179

Tratamiento	Variedad	Ácido fumárico	GABA	Galactosa	Glucosa
C	Cha	0.004116	0.04004	0.076285	1.115348
C	Cha	0.003654	0.04368	0.073876	1.12788
C	Cha	0.003738	0.040495	0.078694	1.165476
C	Cha	0.00378	0.04459	0.078694	1.240668
C	Cha	0.003654	0.044135	0.075482	1.178008
C	Cha	0.004032	0.042315	0.075482	1.228136
C	Tun	0.005856	0.044932	0.074849	0.662728
C	Tun	0.005551	0.043976	0.081577	0.707914
C	Tun	0.005795	0.042542	0.082418	0.700383
C	Tun	0.005612	0.046844	0.071485	0.67779
C	Tun	0.005551	0.042064	0.074849	0.738038
C	Tun	0.005856	0.042542	0.082418	0.700383
C	Ven	0.005292	0.042898	0.074165	0.92157
C	Ven	0.00486	0.045308	0.07498	0.943254
C	Ven	0.005076	0.042898	0.07661	0.997464
C	Ven	0.005076	0.042898	0.077425	0.954096
C	Ven	0.005238	0.042898	0.079055	0.932412
C	Ven	0.005076	0.045308	0.07009	1.073358
Ck	Cha	0.000855	0.000089	0.02934	0.203984
Ck	Cha	0.000891	0.00009	0.029992	0.217892
Ck	Cha	0.000837	0.000095	0.02934	0.222528
Ck	Cha	0.000882	0.000098	0.031296	0.201666
Ck	Cha	0.000792	0.000091	0.031296	0.222528
Ck	Cha	0.000765	0.000087	0.032274	0.224846
Ck	Tun	0.001274	0.000092	0.033488	0.113145
Ck	Tun	0.001222	0.000097	0.034944	0.113145
Ck	Tun	0.001261	0.000092	0.036036	0.117909
Ck	Tun	0.001261	0.000089	0.033852	0.109572
Ck	Tun	0.001235	0.000098	0.031668	0.114336
Ck	Tun	0.001196	0.000091	0.035672	0.108381
Ck	Ven	0.001248	0.000092	0.028388	0.204476
Ck	Ven	0.00117	0.000089	0.026878	0.202368
Ck	Ven	0.001222	0.000094	0.025972	0.206584
Ck	Ven	0.001287	0.000087	0.029596	0.18972
Ck	Ven	0.001287	0.000091	0.029898	0.181288
Ck	Ven	0.001196	0.000095	0.028388	0.191828
W	Cha	0.00927	0.08643	0.032752	1.645616
W	Cha	0.008961	0.09045	0.033464	1.51128
W	Cha	0.010197	0.085425	0.03382	1.544864
W	Cha	0.008755	0.09447	0.035244	1.578448

W	Cha	0.009785	0.085425	0.034532	1.578448
W	Cha	0.009167	0.099495	0.03026	1.528072
W	Tun	0.008004	0.077252	0.03636	0.998758
W	Tun	0.008004	0.07378	0.039996	1.110978
W	Tun	0.007656	0.078988	0.039592	1.077312
W	Tun	0.008091	0.077252	0.035552	1.110978
W	Tun	0.008004	0.085064	0.035956	1.099756
W	Tun	0.007395	0.079856	0.037976	0.998758
W	Ven	0.008645	0.080316	0.03366	1.210585
W	Ven	0.008075	0.076824	0.034452	1.223328
W	Ven	0.009215	0.082935	0.036432	1.223328
W	Ven	0.00874	0.07857	0.034848	1.095898
W	Ven	0.00931	0.076824	0.036432	1.185099
W	Ven	0.00893	0.086427	0.038412	1.210585
Wck	Cha	0.00063	0.000095	0.000095	1.628308
Wck	Cha	0.000672	0.000092	0.000093	1.663706
Wck	Cha	0.000679	0.000088	0.000096	1.699104
Wck	Cha	0.00063	0.000098	0.000095	1.663706
Wck	Cha	0.000665	0.000089	0.000092	1.557512
Wck	Cha	0.000672	0.000094	0.000088	1.681405
Wck	Tun	0.00076	0.000094	0.000092	1.025295
Wck	Tun	0.000776	0.000093	0.000088	1.15493
Wck	Tun	0.000704	0.000087	0.000097	1.03708
Wck	Tun	0.000696	0.000097	0.000093	1.001725
Wck	Tun	0.000776	0.000093	0.000099	1.10779
Wck	Tun	0.000792	0.000087	0.000085	1.08422
Wck	Ven	0.001104	0.000089	0.000093	1.68777
Wck	Ven	0.001188	0.000088	0.000099	1.594005
Wck	Ven	0.001104	0.000096	0.000085	1.612758
Wck	Ven	0.00114	0.000098	0.000099	1.612758
Wck	Ven	0.001104	0.000088	0.000097	1.800288
Wck	Ven	0.00108	0.000086	0.000088	1.650264
G	Cha	0.007396	0.42517	0.12432	5.095636
G	Cha	0.007998	0.435174	0.128205	5.03964
G	Cha	0.008084	0.45018	0.112665	5.543604
G	Cha	0.008084	0.455182	0.128205	5.487608
G	Cha	0.007826	0.440176	0.120435	4.75966
G	Cha	0.008428	0.460184	0.110075	5.31962
G	Tun	0.012015	0.453392	0.062568	1.954225
G	Tun	0.011475	0.506112	0.061936	2.040125
G	Tun	0.012825	0.47448	0.059408	2.0616
G	Tun	0.011475	0.516656	0.06004	2.083075
G	Tun	0.01215	0.511384	0.061304	2.0616
G	Tun	0.011475	0.511384	0.056248	2.126025
G	Ven	0.007623	0.405904	0.207999	6.731364
G	Ven	0.006853	0.405904	0.193292	6.438696
G	Ven	0.006853	0.427964	0.195393	6.292362

G	Ven	0.007623	0.37502	0.180686	7.024032
G	Ven	0.006699	0.405904	0.203797	6.658197
G	Ven	0.007007	0.388256	0.193292	6.950865

Tratamiento	Variedad	Glutamina	Guanosina	Isoleucina	Leucina
C	Cha	0.054723	0.084175	0.000092	0.000095
C	Cha	0.057239	0.080475	0.000096	0.000091
C	Cha	0.057239	0.08325	0.000096	0.000086
C	Cha	0.059755	0.07955	0.000091	0.000094
C	Cha	0.062271	0.086025	0.000091	0.000096
C	Cha	0.057868	0.0814	0.000099	0.000089
C	Tun	0.072105	0.098624	0.000097	0.000087
C	Tun	0.064515	0.102912	0.000089	0.000086
C	Tun	0.072105	0.100768	0.000086	0.000097
C	Tun	0.069069	0.09648	0.00009	0.000086
C	Tun	0.071346	0.099696	0.000087	0.00009
C	Tun	0.070587	0.09648	0.000087	0.000099
C	Ven	0.076428	0.010864	0.000095	0.00009
C	Ven	0.06948	0.011088	0.000097	0.000099
C	Ven	0.071796	0.009632	0.000088	0.000093
C	Ven	0.06562	0.009856	0.000094	0.000094
C	Ven	0.071024	0.009744	0.000088	0.000085
C	Ven	0.075656	0.010752	0.000088	0.000085
Ck	Cha	0.149472	0.049196	0.000086	0.000098
Ck	Cha	0.132345	0.048192	0.000098	0.000085
Ck	Cha	0.151029	0.045682	0.00009	0.000098
Ck	Cha	0.151029	0.046686	0.000091	0.000092
Ck	Cha	0.14013	0.043674	0.000086	0.000093
Ck	Cha	0.135459	0.04267	0.000091	0.000092
Ck	Tun	0.043413	0.049599	0.000095	0.000095
Ck	Tun	0.04491	0.044589	0.000094	0.00009
Ck	Tun	0.045908	0.044589	0.000086	0.000093
Ck	Tun	0.045409	0.043587	0.000094	0.000088
Ck	Tun	0.046407	0.046092	0.000096	0.000089
Ck	Tun	0.048403	0.048096	0.000096	0.000093
Ck	Ven	0.105276	0.078958	0.000095	0.000096
Ck	Ven	0.09622	0.078958	0.000099	0.000089
Ck	Ven	0.104144	0.070004	0.000087	0.00009
Ck	Ven	0.097352	0.071632	0.000096	0.000096
Ck	Ven	0.100748	0.076516	0.000088	0.000085
Ck	Ven	0.105276	0.078958	0.000089	0.000092
W	Cha	0.310816	0.02538	0.074382	0.048285
W	Cha	0.349668	0.027918	0.064515	0.05328
W	Cha	0.349668	0.026508	0.066033	0.050505
W	Cha	0.310816	0.027354	0.067551	0.047175
W	Cha	0.324944	0.025662	0.073623	0.05217

W	Cha	0.321412	0.026508	0.072864	0.053835
W	Tun	0.295872	0.028086	0.066825	0.06318
W	Tun	0.286224	0.025972	0.058725	0.064584
W	Tun	0.27336	0.027784	0.065475	0.065988
W	Tun	0.292656	0.029898	0.06075	0.069498
W	Tun	0.292656	0.02718	0.060075	0.060372
W	Tun	0.283008	0.02718	0.064125	0.068796
W	Ven	0.294066	0.080808	0.056244	0.070965
W	Ven	0.294066	0.07548	0.06213	0.070965
W	Ven	0.313038	0.080808	0.056898	0.06723
W	Ven	0.294066	0.077256	0.061476	0.06723
W	Ven	0.28458	0.081696	0.060822	0.070965
W	Ven	0.309876	0.077256	0.060822	0.068724
Wck	Cha	0.046035	0.061054	0.00009	0.000095
Wck	Cha	0.04752	0.058562	0.000095	0.000093
Wck	Cha	0.047025	0.05607	0.000085	0.00009
Wck	Cha	0.046035	0.060431	0.000087	0.000098
Wck	Cha	0.045045	0.05607	0.000092	0.000092
Wck	Cha	0.04752	0.054201	0.000086	0.000094
Wck	Tun	0.170676	0.066495	0.000094	0.000085
Wck	Tun	0.158608	0.063635	0.000086	0.000088
Wck	Tun	0.158608	0.060775	0.000097	0.000087
Wck	Tun	0.167228	0.067925	0.000094	0.000094
Wck	Tun	0.14654	0.06149	0.000098	0.000087
Wck	Tun	0.158608	0.063635	0.000099	0.000087
Wck	Ven	0.169944	0.080224	0.000091	0.000085
Wck	Ven	0.155928	0.077608	0.000095	0.000096
Wck	Ven	0.150672	0.076736	0.000086	0.000085
Wck	Ven	0.152424	0.085456	0.000089	0.000087
Wck	Ven	0.150672	0.07848	0.000092	0.00009
Wck	Ven	0.16644	0.074992	0.000099	0.000091
G	Cha	0.694464	0.170934	0.285572	0.441936
G	Cha	0.622124	0.158068	0.24769	0.472068
G	Cha	0.716166	0.159906	0.24769	0.497178
G	Cha	0.708932	0.172772	0.285572	0.431892
G	Cha	0.658294	0.180124	0.256432	0.482112
G	Cha	0.672762	0.15623	0.253518	0.467046
G	Tun	0.463617	0.082365	0.170041	0.22734
G	Tun	0.402738	0.083232	0.166535	0.217236
G	Tun	0.416787	0.083232	0.171794	0.224814
G	Tun	0.407421	0.084099	0.163029	0.232392
G	Tun	0.412104	0.07803	0.150758	0.245022
G	Tun	0.412104	0.084099	0.163029	0.232392
G	Ven	0.515312	0.172434	0.181569	0.280953
G	Ven	0.521304	0.192254	0.18783	0.256785
G	Ven	0.545272	0.170452	0.200352	0.293037
G	Ven	0.557256	0.190272	0.181569	0.290016

G	Ven	0.545272	0.182344	0.204526	0.283974
G	Ven	0.581224	0.182344	0.189917	0.27189

Tratamiento	Variedad	Malonato	Metionina	Fenilalanina	Ácido pirúvico
C	Cha	1.975905	0.000092	0.009078	0.000092
C	Cha	2.059101	0.000089	0.009078	0.000095
C	Cha	1.851111	0.000095	0.00969	0.000095
C	Cha	2.059101	0.000091	0.009078	0.000085
C	Cha	1.934307	0.000088	0.00867	0.000095
C	Cha	1.851111	0.000091	0.008772	0.000093
C	Tun	1.025865	0.000095	0.010413	0.000091
C	Tun	1.146555	0.00009	0.009945	0.000086
C	Tun	1.08621	0.000093	0.010062	0.000087
C	Tun	1.08621	0.000088	0.010296	0.000086
C	Tun	1.122417	0.000092	0.011115	0.000095
C	Tun	1.158624	0.000098	0.010296	0.000085
C	Ven	1.56123	0.000089	0.010192	0.000086
C	Ven	1.544796	0.000097	0.010088	0.000094
C	Ven	1.495494	0.000086	0.00936	0.000092
C	Ven	1.626966	0.000096	0.009776	0.00009
C	Ven	1.47906	0.000085	0.009984	0.000097
C	Ven	1.47906	0.000098	0.010296	0.00009
Ck	Cha	0.18513	0.000092	0.00009	0.062062
Ck	Cha	0.181016	0.000098	0.000092	0.066836
Ck	Cha	0.183073	0.000091	0.000086	0.06138
Ck	Cha	0.183073	0.000088	0.000094	0.066836
Ck	Cha	0.201586	0.00009	0.000091	0.05797
Ck	Cha	0.197472	0.000085	0.000098	0.066836
Ck	Tun	0.233404	0.000089	0.000085	0.069696
Ck	Tun	0.255116	0.000097	0.000093	0.074448
Ck	Tun	0.263258	0.000091	0.000096	0.076032
Ck	Tun	0.265972	0.000085	0.000093	0.077616
Ck	Tun	0.260544	0.000088	0.000087	0.072864
Ck	Tun	0.236118	0.000093	0.000088	0.069696
Ck	Ven	0.312039	0.000094	0.000096	0.107573
Ck	Ven	0.30861	0.000087	0.000091	0.107573
Ck	Ven	0.315468	0.000089	0.000091	0.097592
Ck	Ven	0.298323	0.000087	0.000098	0.096483
Ck	Ven	0.294894	0.000091	0.000089	0.108682
Ck	Ven	0.339471	0.000098	0.000094	0.098701
W	Cha	2.79715	0.000099	0.03504	0.000093
W	Cha	3.05735	0.000089	0.03285	0.000085
W	Cha	3.089875	0.000089	0.03139	0.000099
W	Cha	3.024825	0.000091	0.035405	0.000098
W	Cha	3.1224	0.000091	0.032485	0.000099
W	Cha	2.829675	0.000097	0.035405	0.000091

W	Tun	2.117115	0.000089	0.033108	0.000086
W	Tun	2.00079	0.000085	0.036828	0.000098
W	Tun	2.00079	0.000094	0.036828	0.000087
W	Tun	2.04732	0.000085	0.03348	0.000097
W	Tun	2.27997	0.000091	0.034968	0.000093
W	Tun	2.04732	0.000097	0.034968	0.000091
W	Ven	2.339365	0.000096	0.036768	0.000098
W	Ven	2.36565	0.000087	0.034087	0.000089
W	Ven	2.549645	0.000085	0.037534	0.000098
W	Ven	2.52336	0.000085	0.034087	0.000091
W	Ven	2.41822	0.000097	0.037151	0.000092
W	Ven	2.286795	0.000098	0.035619	0.000096
WcK	Cha	2.868008	0.000091	0.000097	0.113477
WcK	Cha	2.96153	0.000094	0.000098	0.118465
WcK	Cha	2.80566	0.00009	0.000097	0.107242
WcK	Cha	2.64979	0.000088	0.000091	0.119712
WcK	Cha	3.023878	0.000085	0.000086	0.117218
WcK	Cha	2.712138	0.000096	0.000088	0.122206
WcK	Tun	2.71237	0.000089	0.000086	0.328077
WcK	Tun	2.65466	0.000093	0.000099	0.362016
WcK	Tun	2.82779	0.000086	0.000096	0.365787
WcK	Tun	2.71237	0.000088	0.000091	0.373329
WcK	Tun	2.510385	0.000095	0.00009	0.343161
WcK	Tun	2.71237	0.000097	0.000099	0.358245
WcK	Ven	2.18785	0.000086	0.000092	0.34731
WcK	Ven	2.04967	0.000095	0.000093	0.34731
WcK	Ven	2.14179	0.000094	0.000097	0.382041
WcK	Ven	2.21088	0.000087	0.000087	0.362746
WcK	Ven	2.04967	0.000087	0.000099	0.34731
WcK	Ven	2.04967	0.000091	0.000099	0.355028
G	Cha	8.191568	0.063245	0.144854	0.000098
G	Cha	8.656998	0.06394	0.135608	0.000094
G	Cha	8.936256	0.068805	0.147936	0.000093
G	Cha	8.098482	0.05977	0.137149	0.000094
G	Cha	8.470826	0.06394	0.13869	0.000091
G	Cha	9.122428	0.061855	0.151018	0.000094
G	Tun	3.428191	0.038037	0.07317	0.000092
G	Tun	3.274115	0.037628	0.077235	0.000095
G	Tun	3.736343	0.036401	0.071544	0.000099
G	Tun	3.389672	0.035174	0.080487	0.00009
G	Tun	3.351153	0.037219	0.078048	0.000093
G	Tun	3.659305	0.039264	0.071544	0.00009
G	Ven	6.5144475	0.077283	0.147404	0.000085
G	Ven	5.922225	0.077283	0.166258	0.000098
G	Ven	5.5932125	0.076452	0.161116	0.000085
G	Ven	6.2512375	0.077283	0.161116	0.000099
G	Ven	5.9880275	0.073128	0.150832	0.000087

G Ven 6.448645 0.080607 0.152546 0.000093

Tratamiento	Variedad	Ácido succínico	Sucrosa	Treonina	Trigonelina
C	Cha	0.048024	1.238619	1.77939	0.026588
C	Cha	0.04698	1.380989	1.88406	0.026877
C	Cha	0.045414	1.324041	1.863126	0.025432
C	Cha	0.051156	1.338278	1.821258	0.026299
C	Cha	0.049068	1.366752	1.88406	0.024854
C	Cha	0.045414	1.380989	1.77939	0.027744
C	Tun	0.047616	1.467942	1.9649	0.032015
C	Tun	0.045568	1.288194	1.98495	0.029319
C	Tun	0.044544	1.363089	1.94485	0.031341
C	Tun	0.047104	1.288194	1.78445	0.031341
C	Tun	0.048128	1.408026	1.94485	0.03033
C	Tun	0.04352	1.273215	1.7243	0.030667
C	Ven	0.046926	1.331974	1.967232	0.030212
C	Ven	0.045978	1.331974	1.762312	0.02988
C	Ven	0.043134	1.451702	1.905756	0.02822
C	Ven	0.044556	1.436736	1.762312	0.028884
C	Ven	0.043608	1.376872	1.782804	0.028884
C	Ven	0.044556	1.481634	1.782804	0.029216
Ck	Cha	0.101235	0.32382	2.0757	0.022185
Ck	Cha	0.116718	0.331016	2.22222	0.024012
Ck	Cha	0.101235	0.327418	2.24664	0.022185
Ck	Cha	0.117909	0.352604	2.0757	0.024012
Ck	Cha	0.115527	0.356202	2.10012	0.025839
Ck	Cha	0.104808	0.309428	2.34432	0.022968
Ck	Tun	0.11419	0.247896	1.810557	0.027807
Ck	Tun	0.10217	0.273249	1.768935	0.029003
Ck	Tun	0.118998	0.239445	2.060289	0.025714
Ck	Tun	0.10818	0.250713	1.87299	0.028106
Ck	Tun	0.111786	0.259164	1.87299	0.026611
Ck	Tun	0.115392	0.270432	1.914612	0.027209
Ck	Ven	0.150787	0.220968	3.151923	0.029211
Ck	Ven	0.152444	0.218736	3.514213	0.031137
Ck	Ven	0.157415	0.220968	3.441755	0.027927
Ck	Ven	0.162386	0.196416	3.550442	0.030816
Ck	Ven	0.142502	0.205344	3.333068	0.031458
Ck	Ven	0.159072	0.218736	3.296839	0.030174
W	Cha	0.034216	1.305164	1.89152	0.03344
W	Cha	0.036096	1.13203	1.91208	0.03168
W	Cha	0.034968	1.13203	1.80928	0.034144
W	Cha	0.033464	1.318482	2.03544	0.032736
W	Cha	0.036096	1.158666	1.91208	0.02992
W	Cha	0.033088	1.251892	1.99432	0.032384
W	Tun	0.030876	1.039041	2.973061	0.026709

W	Tun	0.02988	1.086813	2.907719	0.026402
W	Tun	0.032868	1.062927	2.973061	0.027016
W	Tun	0.030212	1.027098	2.842377	0.027323
W	Tun	0.02988	1.015155	3.038403	0.029472
W	Tun	0.030544	1.110699	3.136416	0.026402
W	Ven	0.026789	1.178199	2.560842	0.030349
W	Ven	0.02709	1.023486	2.424627	0.033077
W	Ven	0.029799	1.047288	2.697057	0.033418
W	Ven	0.027692	1.106793	2.424627	0.031031
W	Ven	0.026187	1.023486	2.479113	0.032736
W	Ven	0.026187	1.166298	2.588085	0.031031
WcK	Cha	0.071974	0.36954	1.293816	0.027244
WcK	Cha	0.067522	0.402388	1.363376	0.025854
WcK	Cha	0.063812	0.34901	1.279904	0.02502
WcK	Cha	0.064554	0.36954	1.32164	0.024742
WcK	Cha	0.069748	0.406494	1.349464	0.023908
WcK	Cha	0.073458	0.361328	1.238168	0.02502
WcK	Tun	0.09843	0.182273	1.196432	0.033201
WcK	Tun	0.09843	0.192288	1.293816	0.033558
WcK	Tun	0.09843	0.192288	1.349464	0.030345
WcK	Tun	0.106536	0.18027	1.196432	0.034986
WcK	Tun	0.103062	0.18027	1.210344	0.030702
WcK	Tun	0.100746	0.196294	1.25208	0.030345
WcK	Ven	0.144091	0.335808	1.685404	0.031365
WcK	Ven	0.147329	0.318318	1.599414	0.035055
WcK	Ven	0.137615	0.318318	1.513424	0.033948
WcK	Ven	0.148948	0.325314	1.496226	0.032103
WcK	Ven	0.155424	0.325314	1.496226	0.033948
WcK	Ven	0.147329	0.31482	1.63381	0.031734
G	Cha	0.083215	0.090356	4.99664	0.015066
G	Cha	0.093005	0.07837	5.172992	0.015228
G	Cha	0.085173	0.091278	5.760832	0.015552
G	Cha	0.087131	0.082058	5.29056	0.01458
G	Cha	0.090068	0.080214	5.525696	0.014256
G	Cha	0.096921	0.080214	5.172992	0.01377
G	Tun	0.10368	0.156	4.752689	0.015552
G	Tun	0.114048	0.141375	4.699288	0.016038
G	Tun	0.107136	0.151125	5.019694	0.01539
G	Tun	0.114048	0.151125	4.645887	0.01539
G	Tun	0.108288	0.138125	4.859491	0.014418
G	Tun	0.09792	0.14625	4.645887	0.014094
G	Ven	0.11889	0.04046	5.272695	0.011954
G	Ven	0.117569	0.043792	5.16051	0.013066
G	Ven	0.126816	0.041412	5.1044175	0.013483
G	Ven	0.129458	0.044268	4.93614	0.011815
G	Ven	0.128137	0.043316	5.38488	0.012927
G	Ven	0.112285	0.043316	4.93614	0.011954

Tratamiento	Variedad	Triptófano	Tirosina	Uracilo	Uridina	Valina
C	Cha	0.03154	0.01089	0.000095	0.000097	0.034452
C	Cha	0.032868	0.011011	0.000089	0.000098	0.038808
C	Cha	0.028884	0.011374	0.000099	0.000089	0.03564
C	Cha	0.032868	0.011858	0.000093	0.000094	0.03762
C	Cha	0.030876	0.010527	0.00009	0.000086	0.038808
C	Cha	0.02822	0.01089	0.000099	0.000087	0.038016
C	Tun	0.03401	0.013034	0.000094	0.00009	0.038352
C	Tun	0.03043	0.012901	0.00009	0.000092	0.035904
C	Tun	0.031504	0.012502	0.000096	0.000091	0.03468
C	Tun	0.03222	0.01197	0.000087	0.00009	0.037128
C	Tun	0.035442	0.012369	0.000088	0.000098	0.03672
C	Tun	0.032578	0.011837	0.000089	0.00009	0.039576
C	Ven	0.035898	0.012328	0.000093	0.000093	0.038528
C	Ven	0.035898	0.011524	0.000096	0.000095	0.042112
C	Ven	0.037828	0.013132	0.000086	0.000092	0.04256
C	Ven	0.035898	0.012194	0.000098	0.000099	0.03808
C	Ven	0.037442	0.012462	0.000088	0.000091	0.043456
C	Ven	0.035126	0.01139	0.000085	0.000099	0.043008
Ck	Cha	0.020116	0.007395	0.020748	0.000094	0.037442
Ck	Cha	0.018618	0.007225	0.021888	0.000089	0.036284
Ck	Cha	0.020758	0.00765	0.022344	0.000094	0.033196
Ck	Cha	0.01819	0.008245	0.021204	0.000098	0.035126
Ck	Cha	0.018832	0.00731	0.02052	0.000087	0.03474
Ck	Cha	0.020972	0.008415	0.022116	0.000099	0.03667
Ck	Tun	0.014058	0.006045	0.038313	0.000097	0.034572
Ck	Tun	0.013064	0.00611	0.034443	0.000098	0.035376
Ck	Tun	0.01349	0.00637	0.037539	0.000093	0.036984
Ck	Tun	0.012922	0.006305	0.035991	0.000093	0.03618
Ck	Tun	0.01278	0.00572	0.038313	0.000088	0.034572
Ck	Tun	0.012496	0.00637	0.035604	0.000086	0.035376
Ck	Ven	0.016192	0.007695	0.03713	0.000096	0.051415
Ck	Ven	0.01672	0.008019	0.03555	0.000098	0.05537
Ck	Ven	0.016544	0.007047	0.039105	0.000097	0.053675
Ck	Ven	0.015136	0.007695	0.033575	0.000086	0.051415
Ck	Ven	0.01584	0.007938	0.03397	0.000088	0.05424
Ck	Ven	0.016016	0.007128	0.036735	0.000095	0.05311
W	Cha	0.04277	0.032669	0.008096	0.022962	0.070594
W	Cha	0.043225	0.031592	0.008008	0.023229	0.068341
W	Cha	0.04186	0.033028	0.008008	0.024831	0.066088
W	Cha	0.040495	0.031592	0.008448	0.024297	0.069092

W	Cha	0.044135	0.033746	0.007744	0.025632	0.069843
W	Cha	0.04186	0.033387	0.008448	0.025899	0.072096
W	Tun	0.042596	0.030176	0.00792	0.023392	0.067868
W	Tun	0.044911	0.03116	0.008712	0.023664	0.06137
W	Tun	0.043522	0.031816	0.008712	0.02584	0.067868
W	Tun	0.039355	0.03116	0.007832	0.025568	0.067868
W	Tun	0.044448	0.031488	0.007744	0.024208	0.070756
W	Tun	0.044911	0.028536	0.008272	0.023936	0.070756
W	Ven	0.044547	0.034104	0.025024	0.010858	0.069687
W	Ven	0.045026	0.037632	0.025024	0.011834	0.068904
W	Ven	0.045984	0.038416	0.026656	0.011956	0.066555
W	Ven	0.046942	0.034496	0.026928	0.011834	0.073602
W	Ven	0.046942	0.034496	0.025568	0.01098	0.07047
W	Ven	0.047421	0.036064	0.026384	0.011956	0.07047
Wck	Cha	0.01813	0.01143	0.019104	0.000095	1010.7
Wck	Cha	0.017945	0.012319	0.019502	0.000091	1100.54
Wck	Cha	0.018315	0.011811	0.01791	0.000085	1066.85
Wck	Cha	0.017945	0.011684	0.018905	0.000095	1021.93
Wck	Cha	0.01702	0.012192	0.01791	0.000099	988.24
Wck	Cha	0.01776	0.011303	0.016915	0.000099	1078.08
Wck	Tun	0.019623	0.001273	0.034496	0.000094	0.203409
Wck	Tun	0.01899	0.0011524	0.030272	0.000098	0.207603
Wck	Tun	0.017935	0.0012864	0.032736	0.000086	0.205506
Wck	Tun	0.019412	0.0013132	0.03344	0.000085	0.199215
Wck	Tun	0.018357	0.0012596	0.030272	0.000095	0.18873
Wck	Tun	0.019201	0.0011792	0.032384	0.000095	0.190827
Wck	Ven	0.016368	0.017557	0.028388	0.000087	0.152427
Wck	Ven	0.018228	0.017195	0.02567	0.000089	0.157344
Wck	Ven	0.01581	0.01629	0.028086	0.000089	0.154066
Wck	Ven	0.016182	0.015385	0.027784	0.000096	0.162261
Wck	Ven	0.017856	0.017195	0.02869	0.000096	0.145871
Wck	Ven	0.018228	0.017014	0.026576	0.000089	0.142593
G	Cha	0.025662	0.062496	0.302247	0.032178	0.313113
G	Cha	0.024297	0.065184	0.290035	0.030102	0.334707
G	Cha	0.024843	0.061152	0.286982	0.030794	0.316712
G	Cha	0.023205	0.06384	0.302247	0.033562	0.345504
G	Cha	0.025389	0.062496	0.286982	0.033908	0.349103
G	Cha	0.025116	0.05712	0.27477	0.030448	0.32391
G	Tun	0.02299	0.039788	0.137046	0.04947	0.191828
G	Tun	0.02299	0.03654	0.140058	0.05238	0.193936
G	Tun	0.022748	0.039788	0.141564	0.05529	0.191828
G	Tun	0.020812	0.037758	0.138552	0.055872	0.18972
G	Tun	0.020812	0.038164	0.140058	0.057036	0.187612
G	Tun	0.021054	0.035728	0.137046	0.054126	0.185504
G	Ven	0.031856	0.06255	0.300312	0.04674	0.502047
G	Ven	0.032942	0.06533	0.303804	0.044772	0.485496
G	Ven	0.032218	0.068805	0.33174	0.042804	0.474462

G	Ven	0.035476	0.061855	0.338724	0.047724	0.507564
G	Ven	0.035838	0.066025	0.303804	0.042804	0.474462
G	Ven	0.031856	0.067415	0.300312	0.04428	0.540666

ANEXO 2: TABLAS TUKEY COMPLETAS

Tabla 12.

Tukey del tratamiento de control (C)

Metabolito	Tun	Ven	Cha
Ácido acético	a	a	b
Alanina	a	a	a
Acido aspártico	a	b	ab
Betaina	a	a	a
Colina	a	b	ab
Acido fórmico	a	b	b
GABA	a	a	a
Galactosa	a	a	a
Glucosa	a	b	c
Glutamina	a	a	b
Isoleucina	a	a	a
Leucina	a	a	a
Malonato	a	b	c
Metionina	a	a	a
Fenilalanina	a	a	b
Acido pirúvico	a	a	a
Acido succínico	ab	a	b
Sucrosa	a	a	a
Treonina	a	a	a
Trigonelina	a	b	c
triptófano	a	b	a
Tirosina	a	a	b
Uracilo	a	a	a
Uridina	a	a	a

Valina	a	b	a
--------	---	---	---

Tabla 13.

Tukey del tratamiento de cocción (Ck)

Metabolito	Tun	Ven	Cha
Adenosina	a	a	b
Alanina	a	ab	b
Asparagina	a	ab	b
Acido aspártico	a	a	a
Betaina	a	b	b
Colina	a	a	b
GABA	a	a	a
Galactosa	a	b	c
Isoleucina	a	a	a
Leucina	a	a	a
Malonato	a	b	c
Metionina	a	a	a
Fenilalanina	a	a	a
Sucrosa	a	b	c
Trigonelina	a	b	c
triptófano	a	b	c
Tirosina	a	b	b

Tabla 14.*Tukey del tratamiento de lavado (W)*

Metabolito	Tun	Ven	Cha
Ácido acético	a	a	a
Asparagina	a	b	c
Betaina	a	b	b
Colina	a	b	c
Ácido fumárico	a	b	b
GABA	a	a	b
Galactosa	a	ab	b
Glutamina	a	a	b
Isoleucina	a	a	b
Malonato	a	b	c
Metionina	a	a	a
Fenilalanina	a	a	a
Acido pirúvico	a	a	a
Acido succínico	a	b	c
Treonina	a	b	c
Triptófano	a	b	a
Tirosina	a	b	a
Valina	a	a	a

Tabla 15.*Tukey del tratamiento de lavado y cocción (Wck)*

Metabolito	Tun	Ven	Cha
Alanina	a	b	a
Asparagina	a	a	a
Acido aspártico	a	a	a
Colina	a	b	c
GABA	a	a	a
Galactosa	a	a	a

Guanosina	a	b	c
Isoleucina	a	a	a
Leucina	a	ab	b
Metionina	a	a	a
Treonina	a	b	a
Triptófano	a	b	ab
Uridina	a	a	a

Tabla 16.

Tukey del tratamiento de germinación (G)

Metabolito	Tun	Ven	Cha
Ácido acético	a	a	a
Adenosina	a	ab	b
Asparagina	a	a	a
Ácido aspártico	a	a	a
Betaina	a	b	b
Colina	a	a	b
GABA	a	b	c
Glutamina	a	b	c
Acido pirúvico	a	a	a
Acido succínico	a	b	c
Treonina	a	b	b
Trigonelina	a	b	a
Uridina	a	b	c

ANEXO 3: RStudio

Figura 9.

Entorno de trabajo RStudio

