

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS



**“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, TOCOLES,
CAROTENOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE 20
GENOTIPOS DE TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet)”**

Presentada por:

LUIS ANTONIO BRICEÑO BERRÚ

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

Lima – Perú

2024

Tesis Doctorado Ciencia Alimentos (Briceño 1)

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	14%	5%	5%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	repositorio.unjfsc.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	revistabiociencias.uan.mx Fuente de Internet	1%
5	idoc.pub Fuente de Internet	1%
6	docplayer.es Fuente de Internet	1%
7	dev.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
8	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
9	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	1%

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS

**“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA,
TOCOLES, CAROTENOIDES Y CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE 20 GENOTIPOS DE TARWI
(*Lupinus mutabilis* Sweet)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

LUIS ANTONIO BRICEÑO BERRÚ

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Eduardo Morales Soriano
PRESIDENTE

Ph.D. Patricia Glorio Paulet
ASESORA

Dra. Alyssa Hidalgo Vidal
CO-ASESORA

Ph.D. Ritva Repo de Carrasco
MIEMBRO

Dra. Bettit Salvá Ruiz
MIEMBRO

Ph.D. Fulgencio Vilcanqui Perez
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres por sus sacrificios, porque siempre me impulsaron a ser mejor cada día y porque con su ejemplo de honradez, decencia y dignidad siguen siendo el faro que ilumina mi camino.

A la memoria de mis hermanos idos y a mis hermanos presentes, quienes fueron y son el principal referente de lucha, esfuerzo y superación.

A mis hijos Luis Miguel, Jimena Daniela y Luis Eduardo, mi motivación y mi alegría, para que cada una de mis metas alcanzadas les quede como ejemplo.

A la memoria y recuerdo de mi pequeño Renzo Edgardo, por quien mi corazón aún llora su ausencia. Te extraño profundamente y esta dedicatoria es mi pequeña forma de decirte que siempre estás en mi mente y en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, PhD. Patricia Glorio Paulet por darme la oportunidad de participar en el proyecto PNIA (Programa Nacional de Innovación Agraria) para realizar esta investigación y por sus importantes sugerencias brindadas.

Mi más profundo agradecimiento a mi co-asesora Dra. Alyssa Hidalgo Vidal por su valiosa colaboración y experiencia en el desarrollo de los análisis de laboratorio ejecutados en la Universidad de Milán, Italia, y su gran apoyo en las publicaciones científicas.

Al Dr. Felix Camarena Mayta, Jefe del Programa de Leguminosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por permitirme participar como becario dentro del proyecto PNIA (Programa Nacional de Innovación Agraria) y por facilitarme las muestras de tarwi para el desarrollo de esta investigación.

Al Prof. Alessio Scafaroni, del Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), University of Milan, Italia, por su gran colaboración para el desarrollo de los análisis de electroforesis.

Al Dr. Andrea Brandolini, del Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Animal Production and Aquaculture (CREA-ZA), Lodi, Italia, todo el apoyo para el logro de las publicaciones científicas.

A Chiara Muratore y Andrea Basso, del Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), University of Milan, Italia, por su gran colaboración en la ejecución de los análisis de laboratorio.

Al Mg. Sc. Gustavo Puma I. por su apoyo en el tratamiento estadístico de los datos.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por su apoyo financiero para mi viaje y estadía en Italia para realizar parte experimental de esta tesis en la Universidad de Milán.

A la Universidad de Milán, Italia por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de usar sus instalaciones y laboratorios, los que han sido fundamentales para la finalización de esta tesis.

A los miembros del jurado, Dr. Eduardo Morales S., PhD. Ritva Repo C, Dra. Bettit Salvá R. y PhD. Fulgencio Vilcanqui P. por sus correcciones y valiosas sugerencias realizadas a la tesis.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO LUPINO	3
2.1.1	Clasificación botánica de los lupinos	4
2.1.2	Composición química y valor nutricional.....	4
2.1.3	Proteínas en el género lupino	6
2.1.4	El desamargado del lupino	10
2.1.5	Usos de los lupinos	12
2.1.6	Alergenicidad del lupino	13
2.2	ANTIOXIDANTES	15
2.2.1	ROS, Antioxidantes, actividad antioxidante y capacidad antioxidante	15
2.2.2	Métodos para determinar la capacidad antioxidante.....	17
2.2.3	Capacidad antioxidante en el lupino	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	26
3.2	MUESTRAS	26
3.3	REACTIVOS	26
3.4	MATERIALES.....	29
3.5	EQUIPOS E INSTRUMENTOS	30
3.6	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	31
3.7	DESAMARGADO DEL TARWI	31
3.8	ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	31
3.9	PROTEÍNA SOLUBLE	31
3.10	SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTÉICAS POR ELECTROFORESIS Y DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR	32
3.11	TOCOFEROLES Y CAROTENOIDES	33
3.12	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	33
3.13	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
3.14	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	33

IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS 20 GENOTIPOS DE TARWI (<i>LUPINUS MUTABILIS</i>)	36
4.2	DESAMARGADO DEL TARWI	40
4.3	COMPOSICIÓN QUÍMICO PROXIMAL DE LOS 20 GENOTIPOS DE LUPINO (<i>LUPINUS MUTABILIS</i>).....	47
4.4	CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE EN MUESTRAS AMARGAS Y DESAMARGADAS	51
4.5	SEPARACIONES ELECTROFORÉTICA DE LAS FRACCIONES PROTÉICAS.....	52
4.5.1	Separaciones electroforética de las fracciones protéicas de las muestras sin desamargar	53
4.5.2	Separaciones electroforética de las fracciones protéicas de las muestras desamargadas	55
4.5.3	Estimación de rangos de peso molecular de las fracciones proteicas de los 20 ecotipos de tarwi en estudio	57
4.6	TOCOFEROLES	59
4.7	CAROTENOIDES	62
4.8	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	65
V.	CONCLUSIONES.....	73
VI.	RECOMENDACIONES.....	75
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
VIII.	ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Composición química del chocho o tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>) (g/100 g)	5
Tabla 2:	Contenido de proteína de los principales cereales, legumbres, semillas oleaginosas y fuentes vegetales	5
Tabla 3:	Principales características de las conglutinas del <i>Lupinus albus</i>	6
Tabla 4:	Principales características de las conglutinas del <i>L. angustifolius</i> en condiciones reductoras y no reductoras	8
Tabla 5:	Relación y procedencia de los ecotipos de <i>Lupinus mutabilis</i> usados en la investigación	27
Tabla 6:	Características morfológicas de los ecotipos de tarwi	37
Tabla 7:	Incremento en el peso (%) después del hervido por una hora en las muestras que habían sido remojadas por 12 horas	43
Tabla 8:	Pérdida de peso (%), con respecto al peso inicial (bs) de los granos, después del secado de las muestras desamargadas	46
Tabla 9:	Análisis químico proximal de los 20 ecotipos de tarwi amargo (<i>Lupinus mutabilis</i>) (g/100 g)	48
Tabla 10:	Resultados (Promedio \pm desviación estándar) de la determinación del contenido de proteína soluble en los 20 ecotipos de tarwi en muestras amargas y desamargadas	52
Tabla 11:	Número de bandas por rango de peso molecular (PM)	57
Tabla 12:	Contenido promedio de tocoferoles (mg/kg MS) en los 20 ecotipos de tarwi amargo y desamargado	60
Tabla 13:	Contenido promedio de carotenoides (mg/kg MS) en los 20 ecotipos de tarwi amargo y desamargado	63
Tabla 14:	Valor medio \pm error estándar de la capacidad antioxidante (mmol TE/Kg MS) de las semillas desamargadas de los 20 ecotipos de tarwi y de las muestras testigo	66
Tabla 15:	Capacidad antioxidante de los 20 ecotipos de tarwi (Milimol Trolox equivalente/kg ms). Métodos PR (Poder Reductor), ABTS, FRAP y DPPH ...	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de las fracciones proteicas del <i>L. albus</i> obtenidas mediante precipitación isoeléctrica y precipitación isoeléctrica con Zn ²⁺	9
Figura 2: SDS-PAGE bajo condiciones reductoras en aislados proteicos de <i>L. albus</i> a diferentes valores de pH de extracción.....	9
Figura 3: Distribución geográfica de los ecotipos de tarwi analizados.....	27
Figura 4: Proceso seguido para el desamargado acuoso de los granos de tarwi	32
Figura 5: Diseño experimental de la investigación	35
Figura 6: Fotografía de los ecotipos de tarwi analizados	38
Figura 7: Parámetros del color L*, a*, b* de las harinas de los 20 ecotipos de tarwi sin desamargar y de las muestras testigo	39
Figura 8: Absorción de agua de los 20 ecotipos de tarwi durante las primeras 12 horas de remojo	41
Figura 9: Incremento de peso (%) luego del hervido por una hora con respecto a las muestras remojadas por 12 horas.....	44
Figura 10: Incremento en el peso luego del remojo y lavado durante cinco días con respecto a las muestras remojadas por 12 horas y hervidas por una hora.....	45
Figura 11: Pérdida de peso (%), con respecto al peso inicial (bs) de los granos, después del secado de las muestras desamargadas.....	47
Figura 12: Perfil electroforético en condiciones reductoras (+) y no reductoras (-) de las muestras de tarwi sin desamargar	53
Figura 13: Perfil electroforético de los 20 ecotipos de tarwi sin desamargar	54
Figura 14: Perfil electroforético de los 20 ecotipos de tarwi desamargado	56
Figura 15: Contenido total de tocoferoles en los 20 ecotipos de tarwi	61
Figura 16: Contenido total de carotenoides en los 20 ecotipos de tarwi.....	64
Figura 17: Capacidad antioxidante de los 20 ecotipos de tarwi (Milimol Trolox equivalente/kg ms).....	70
Figura 18: Análisis de componentes principales de los ecotipos de tarwi y testigos.....	72

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1:	Método de Bradford para la determinación de la proteína soluble.....	90
Anexo 2:	Protocolo para los ensayo de electroforesis en gel (PAGE-SDS).....	93
Anexo 3:	Protocolo para la extracción de los carotenoides y los tocoferoles	95
Anexo 4:	Protocolos para la determinación de la capacidad antioxidante	97
Anexo 5:	Parámetros de color L*, A*, B* de las harinas de los 20 ecotipos de tarwi.....	102
Anexo 6:	Resultados del análisis de varianza	103

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo caracterizar las semillas de 20 ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis*) procedentes de diferentes zonas andinas del Perú. A las semillas sin desamargar, se les determinó las características morfológicas y la composición química proximal. En las semillas amargas y desamargadas se determinó el contenido de tocoferoles y carotenoides totales, el perfil electroforético mediante electroforesis SDS-Page, se estimó el rango de pesos moleculares y se cuantificó la capacidad antioxidante mediante cuatro métodos (RP, ABTS, DPPH y FRAP). El contenido de proteína (promedio 41.8 por ciento) fue superior al de las muestras testigo *L. angustifolius* (29.16 por ciento), *L. albus* (31.02 por ciento) y *L. luteus* (39.03 por ciento); el contenido de grasa (promedio 16.17 por ciento) fue muy superior también al de las muestras testigo *L. angustifolius* (5.15 por ciento), *L. albus* (8.41 por ciento) y *L. luteus* (14.3 por ciento). El contenido de proteína soluble varió entre 14.1 por ciento y 33.2 por ciento en las semillas amargas y entre 0.3 por ciento y 1.6 por ciento en las semillas desamargadas. Los perfiles electroforéticos de los 20 ecotipos, tanto en las muestras amargas como desamargadas fueron idénticos, detectándose bandas mejor diferenciadas entre aproximadamente 14 y 66 kDa, mientras que en el rango de 67-91 kDa no se detectó ninguna banda. Las semillas desamargadas presentaron altos niveles de tocoferoles (319.76 mg/kg MS, promedio), comparadas con las muestras testigo (103.22 – 260.82 mg/kg MS); mientras que, el contenido de carotenoides fue menor (1.70 mg/kg MS, promedio) que en el caso de las muestras testigo (1.05 – 7.14 mg/kg MS). La capacidad antioxidante promedio (mmol TE/Kg MS) de los 20 ecotipos de tarwi (2.65, 40.17, 2.63 y 18.41 con los métodos PR, ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente), fue mayor que en las muestras testigo *L. albus* (1.03, 7.41, 2.69 y 2.30); *L. angustifolius* (0.89, 9.23, 1.48 y 5.08), *L. luteus* (4.01, 31.34, 5.54, 12.44). El tarwi (*L. mutabilis*) caracterizado mostró una mayor riqueza en proteínas y compuestos bioactivos tales como tocoferoles y capacidad antioxidante, perfilándose como un insumo a elección para el desarrollo de alimentos basados en proteínas vegetales.

Palabras claves: Tarwi, tocoferoles, carotenoides, capacidad antioxidante

ABSTRACT

The objective of this research was to characterize the seeds of 20 ecotypes of tarwi (*Lupinus mutabilis*) from different Andean areas of Peru. Morphological characteristics and proximate chemical composition were determined for bitter seeds. In bitter and debittered seeds, the total tocopherol and carotenoid content was determined, the electrophoretic profile was determined by SDS-Page electrophoresis, the range of molecular weights was estimated and the antioxidant capacity was quantified by four methods (RP, ABTS, DPPH and FRAP). Protein content (average 41.8 percent) was higher than that of the control samples *L. angustifolius* (29.16 percent), *L. albus* (31.02 percent) and *L. luteus* (39.03 percent); fat content (average 16.17 percent) was also much higher than that of the control samples *L. angustifolius* (5.15 percent), *L. albus* (8.41 percent) and *L. luteus* (14.3 percent). The soluble protein content ranged from 14.1 percent to 33.2 percent in the bitter seeds and from 0.3 percent to 1.6 percent in the unbittered seeds. The electrophoretic profiles of the 20 ecotypes, both in the bitter and unbittered samples were identical, detecting better differentiated bands between approximately 14 and 66 kDa, while in the range of 67-91 kDa no band was detected. The unbittered seeds presented high levels of tocopherols (319.76 mg/kg DM, average), compared to the control samples (103.22 - 260.82 mg/kg DM); whereas, the carotenoid content was lower (1.70 mg/kg DM, average) than in the case of the control samples (1.05 - 7.14 mg/kg DM). The average antioxidant capacity (mmol TE/kg DM) of the 20 tarwi ecotypes (2.65, 40.17, 2.63 and 18.41 with PR, ABTS, DPPH and FRAP methods, respectively), was higher than in the control samples *L. albus* (1.03, 7.41, 2.69 and 2.30); *L. angustifolius* (0.89, 9.23, 1.48 and 5.08), *L. luteus* (4.01, 31.34, 5.54, 12.44). The characterized tarwi (*L. mutabilis*) showed a higher richness in proteins and bioactive compounds such as tocopherols and antioxidant capacity, thus emerging as an input of choice for the development of plant protein-based foods.

Key words: Tarwi, tocopherols, carotenoids, antioxidant capacity.

I. INTRODUCCIÓN

El lupino (*Lupinus mutabilis* S.), conocido también como chocho y tarwi, es una leguminosa que se cultiva en las zonas andinas del Perú. Según Borja (2014), es de un alto contenido protéico, 41 a 51 por ciento; sin embargo, el grano contiene alcaloides, que limitan su uso directo en la alimentación humana y animal. Por otro lado, Dooper *et al.* (2009) reportaron un incremento en el uso de la harina de lupino de cuatro especies (*Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteos*, *Lupinus mutabilis*) en productos de panadería y en alimentos saludables en Europa, y que paralelamente también se han incrementado los casos o episodios de alergias alimenticias causadas por el lupino.

Diversos estudios se han realizado sobre el lupino; sin embargo, estos estudios se han hecho mayormente sobre especies diferentes del *Lupinus mutabilis*. Chirinos-Arias (2015) indica que hay muy pocos estudios sobre este cultivo y que muchas de sus ventajas no han sido estudiadas o están en fases preliminares. Asimismo, Czubinski *et al.* (2021) indican que el *Lupinus mutabilis*, conocido como lupino Andino, ha ganado un creciente interés en años recientes pero que, sin embargo, existe escasa información detallada sobre las características químicas de las semillas cultivadas en la región de Europa. En el presente estudio se busca caracterizar morfológica y fisicoquímicamente, y determinar la capacidad antioxidante en 20 ecotipos de semilla de tarwi (*Lupinus mutabilis*), amargo y desamargado, que es la especie de lupino que se produce en diversas zonas del Perú, de las cuales existe muy pocos datos al respecto. De esta manera, se pretende contribuir a solucionar este problema de escasez de reportes sobre los diversos ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis*) que se producen en el Perú, lo que permitirá un mejor uso de este recurso como una fuente importante de proteínas para la alimentación humana, y como un potencial recurso con características funcionales desde el punto de vista de la salud.

En el presente estudio se planteó como objetivo general, caracterizar las semillas amargas y desamargadas) de 20 ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis*) procedentes de diferentes zonas andinas del Perú. Como objetivos específicos se planteó determinar en los 20 ecotipos de

tarwi amargo (*Lupinus mutabilis*): las características morfológicas y fisicoquímicas de las semillas enteras. En los granos desamargados por método acuoso: el porcentaje de pérdida de sólidos después del proceso de desamargado. El contenido de proteína soluble en las muestras amargas y desamargadas; el perfil electroforético de las proteínas aisladas de las muestras amargas y desamargadas; el contenido de tocoferoles y carotenoides en las semillas enteras amargas y desamargadas; y finalmente la capacidad antioxidante de las semillas desamargadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO LUPINO

Martín (2017) menciona que el altramuz, nombre con el que se le conoce al lupino en España, es una leguminosa que ha venido cultivándose más para forraje que para la producción de semilla porque ésta contiene un componente tóxico que requiere un tratamiento adecuado para poderla utilizarla como alimento del ganado.

Khan *et al.* (2015) indican que se ha encontrado en la naturaleza alrededor de 400 especies de lupino, mientras que Annicchiarico *et al.* (2014) mencionan más de 450 especies, de las cuales, solo unas pocas han sido estudiadas en cuanto a sus características agronómicas y su valor nutritivo, entre ellas, lupino blanco (*Lupinus albus*), lupino azul (*Lupinus angustifolius*), lupino amarillo (*Lupinus luteus*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*). Por otro lado, Gresta *et al.* (2017) explican que el género lupino incluye alrededor de 170 especies, de las cuales 12 son nativas de Europa o del área del Mediterráneo: *L. albus*, *L. anatolicus*, *L. angustifolius*, *L. atlanticus*, *L. cosentinii*, *L. digitatus*, *L. hispanicus*, *L. luteus*, *L. micranthus*, *L. pilosus*, *L. palaestinus* y *L. prince*; indican además que, sólo cuatro especies han sido domesticadas: tres provienen del “Viejo Mundo”, *L. albus* (lupino blanco), *L. angustifolius* (narrow leafed o lupino azul) y *L. luteus* (lupino amarillo); y una del “Nuevo Mundo”, *L. mutabilis*, llamado también tarwi o chocho. También, Neves *et al.* (2016) resaltan que, dentro de las especies de lupino, el tarwi destaca por ser casi la única especie cultivada americana, entre 300 silvestres. Por su parte, Pate *et al.* (1985), citados por Carvajal-Larenas *et al.* (2016), mencionan que se cultivan cuatro especies principales de lupino: *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus mutabilis*, de las cuales esta última tiene el mayor contenido medio de proteínas (44 por ciento de peso seco) y de lípidos (18 por ciento de peso seco).

Por lo que respecta a su sabor, Martín (2017) indica se debe distinguir entre variedades de semilla amarga y dulce. Las semillas amargas contienen, además, alcaloides tóxicos, tales

como la lupanina y la oxilupanina, que dan lugar a la intoxicación denominada «lupinosis», caracterizada por la aparición de diarreas, trastornos hepáticos (ictericia), depresivo, anorexia, poca movilidad, dificultad respiratoria, ictericia, hematuria, temblores, tambaleo y muerte por asfixia.

La presencia de alcaloides es el principal problema de semillas amargas, ya que contienen un 2,5 por 100 o más de estas sustancias que producen el lupinismo. Suca y Suca (2015) informan que el rango de contenido de alcaloides en tarwi va de 2.56 (g/100 g) hasta 4.14 (g/100 g), y que los niveles de alcaloides comprendidos en un rango de 10 a 25 mg/Kg se consideran tóxicos para niños pequeños; mientras que niveles de 25 a 45 mg/Kg son tóxicos para adultos; para que el consumo de tarwi sea seguro, el contenido de alcaloides debe estar por debajo de 0.02 por ciento. Por su parte, Martín (2017) indica que en las variedades dulces el contenido de alcaloides viene a ser de 0.01 por ciento a 0.03 por ciento, y que se considera que el riesgo de toxicidad es nulo cuando el contenido de alcaloides es inferior al 0.05 por ciento.

2.1.1 Clasificación botánica de los lupinos

Jacobsen y Mujica (2006), citados por Chirinos-Arias (2015), mencionan que el *Lupinus mutabilis* Sweet, planta conocida comúnmente como ullush, talwish, tauri, tarwi, chocho, lupino o ccquilla pertenece a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Fabales, familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae, siendo su género *Lupinus* el más abundante de la familia. Se distribuye en diferentes partes del mundo incluyendo América del Sur, Europa y Australia. Pero principalmente en los valles interandinos y el Altiplano de Bolivia y Perú. Sin embargo, indica Chirinos-Arias (2015), su centro de origen es debatible siendo el más probable entre los Andes del norte de Perú y sur de Ecuador. Dentro del género *Lupinus* las cuatro especies de interés para la agricultura son: lupino blanco (*Lupinus albus*), lupino azul (*Lupinus angustifolius*), lupino amarillo (*Lupinus luteus*) y lupino Andino (*Lupinus mutabilis*) (Nadal *et al.*, 2011).

2.1.2 Composición química y valor nutricional

En la Tabla 1 se presentan los principales componentes de la semilla amarga del chocho (*Lupinus mutabilis*) reportada por algunos autores. Destaca el alto contenido de proteína (47.8 por ciento), mucho mayor que otras especies de lupino y que otros granos, inclusive

mayor que la soya (Tabla 2); los carbohidratos y el extracto libre de nitrógeno (ELN) constituyen valores intermedios. El ELN es una categoría del sistema Weende que se encuentra constituido principalmente por carbohidratos digeribles, así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados (FAO 1993). Un aspecto importante de la composición química del tarwi es que presenta un bajo contenido de almidón en comparación con otros granos como cereales y menestras.

Tabla 1: Composición química del chocho o tarwi (*Lupinus mutabilis*) (g/100 g)

Componente	Fuente del estudio						
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Agua	10.1	7.7	8.1	-	11.7	9.6	6.2
Proteína bruta (N x 6.25) ^a	47.8	44.3	43.3	48.2	44.7	44.9	47.7
Grasa bruta ^a	18.9	16.5	18.9	16.2	15.4	13.9	15.0
Cenizas ^a	4.5	3.3	3.9	4.8	-	5.5	3.2
Fibra cruda o bruta ^a	11.1	7.1	8.2	-	-	8.6	7.5
Carbohidratos ^a	-	28.2	32.9	31.7	-	-	-
ELN ^a	17.6	-	-	-	-	27.1	26.6
Almidón total	4.3	-	-	-	-	-	-
Azúcares totales	2.0	-	-	-	-	-	-
Azúcares reductores	0.4	-	-	0.9	-	-	-
Alcaloides	3.3	-	-	-	-	-	-

^a Porcentajes en base seca para la semilla amarga. (-) No reportado por el autor.

Fuentes: (1) Villacrés *et al.* (2006). (2) Repo-Carrasco-Valencia (2014). (3) Carvajal-Larenas *et al.* (2016). (4) Córdova-Ramos *et al.* (2020a). (5) Czubinski *et al.* (2021). (6) Ortega-David *et al.* (2010). (7) Shoeneberger *et al.* (1982).

Tabla 2: Contenido de proteína de los principales cereales, legumbres, semillas oleaginosas y fuentes vegetales

Producto	Proteína (%)
Soya ⁽¹⁾	35 – 40
Frijol ⁽¹⁾	20 – 30
Garbanzo ⁽¹⁾	20 – 25
Trigo (harina) ⁽¹⁾	8 – 15
Arroz ⁽¹⁾	7 – 9
Maíz ⁽¹⁾	9 – 12
Cebada (descascarada) ⁽¹⁾	8 – 15
Sorgo ⁽¹⁾	9 – 17
<i>Lupinus mutabilis</i> ⁽¹⁾	40 – 55
<i>Lupinus albus</i> ⁽²⁾	29.3
<i>Lupinus barkeri</i> ⁽²⁾	37.1
<i>Lupinus montanus</i> ⁽²⁾	35.3
<i>Lupinus angustifolius</i> ⁽¹⁾	
<i>Lupinus luteus</i> ⁽¹⁾	

Fuentes: (1) Borja (2014). (2) Guemes-Vera *et al.* (2012).

2.1.3 Proteínas en el género lupino

Nadal *et al.* (2011) indican que Osborne en 1924 clasificó las proteínas en cuatro grupos, sobre la base de sus características de extracción y solubilidad: albúminas, globulinas, gluteninas, y prolaminas. Asimismo, explica que, “La fracción de globulinas de las proteínas del *Lupinus albus* (Tabla 3) consiste de dos grupos mayoritarios de globulinas llamadas α -conglutinas (11S y “leguminlike”), representando alrededor de 33 por ciento de las proteínas totales, y β -conglutinas (7S y “vicilin-like”), que representan otro 45 por ciento. Hay dos globulinas adicionales en menor cantidad llamadas γ - y δ -conglutina, las cuales representan el 5 por ciento y 12 por ciento. Algunos reportes han sub-clasificado posteriormente la δ -conglutina en $\delta 1$ - y $\delta 2$ conglutina”.

Tabla 3: Principales características de las conglutinas del *Lupinus albus*

Conglutina	Porcentaje del total de globulinas	Peso molecular (kDa)	Proteína nativa			Después de la reducción	
			pI	Estructura cuaternaria	Tamaño de subunidad (kDa)	Cadena pesada	Cadena ligera
α -conglutina	35-37	330-430	5.6–	Hexámero	53	31	19
			5.9		60	36	19
					66	42	19
					70	46	19
β -conglutina	44-45	143-260	5.9– 6.2	Trímero	19-60	Sin enlaces disulfuro	
δ -conglutina	10-12	13	4.3	Monómero		9	4
γ -conglutina	4-5	200	7.9	Tetramero	47	29	17

Fuente: Nadal *et al.* (2011).

Por su parte, Czubinski *et al.* (2021) indican que las proteínas de las semillas del *L. mutabilis* son principalmente la α -conglutina y la β -conglutina (ambas constituyen más del 80 por ciento de todas las proteínas aisladas de estas semillas); en el caso de la γ -conglutina, su contenido generalmente es el mismo entre las diversas especies de lupino, así como entre los diversos cultivares dentro de cada especie; explica además que, la proporción de las fracciones de α -conglutinas y β -conglutinas es característica de un tipo particular de semilla de lupino y puede ser usada para distinguir entre diferentes especies; en el caso del *L. mutabilis*, esta ratio es de 1:1, similar al del *L. angustifolius*, mientras que en otras especies se presentan ratios de 1:2 (*L. albus*). Agrega que, diversos estudios han resaltado

considerables diferencias en la estructura y composición de la α -conglutina y la β -conglutina en *L. mutabilis* comparada con *L. albus*, y que también se ha encontrado que el perfil de las fracciones de la α -conglutina del *L. mutabilis* muestra diferencias entre los diversos genotipos.

Por otro lado, Carvajal-Larenas *et al.* (2016) mencionan que en *L. mutabilis*, a diferencia de algunas otras especies de lupino, no se ha reportado la presencia de δ -conglutina; agrega además que, las albúminas representan alrededor del 12.8 por ciento, 15.4 por ciento y 5 a 10 por ciento % en *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius*, respectivamente; no indican el porcentaje en el *L. mutabilis*, pero mencionan que se ha reportado que el *L. albus* contiene aproximadamente el doble de albúminas que el *L. mutabilis* “Potosí” e “Inti”.

Con respecto al peso molecular de las diferentes fracciones proteicas del lupino (*L. angustifolius*), Muranyi *et al.* (2016) mencionan que, la conglutina α está compuesta por tres sub-unidades unidas no covalentemente, con pesos moleculares de 64, 72 y 85 kDa; estas sub-unidades a la vez están compuestas por polipéptidos alcalinos de 21-24 kDa y polipéptidos ácidos de 42-62 kDa, unidos intermolecularmente por enlaces disulfuro. Mientras que, Melo *et al.* (1994), citados por Muranyi *et al.* (2016), indican que la conglutina α consta de cuatro sub-unidades, con tamaños de 53, 60, 66 y 70 kDa y exhibe pI de 5.1-5.8. La conglutina β es la única proteína del lupino libre de enlaces disulfuro, por lo tanto, las bandas de los perfiles de SDS-PAGE son idénticas en condiciones reductoras y no reductoras; la forma prevalente de esta proteína es trimérica, oligómeros de 150-170 kDa, aunque también forma tetrámeros; el tamaño de las sub-unidades fluctúa entre 20 y 70 kDa, cada uno de los cuales está compuesto de 10 a 12 polipéptidos distintos y mayormente glicosilados. La conglutina δ está compuesta por dos fracciones: la conglutina δ_2 , monómero de 14 kDa constituido por dos cadenas de polipéptidos, una pesada de 9.5 kDa y otra ligera de 4.5 kDa (a pH neutro esta conglutina forma un dímero de 28 kDa), y la conglutina δ_1 , que se asocia por medio de enlaces disulfuro formando agregados oligoméricos de hasta 56 kDa. Por su parte, Magni *et al.* (2004) explican que, en *Lupinus albus* la conglutina γ representa el 5 por ciento del total de las globulinas y es una glicoproteína con un peso molecular relativo de alrededor de 47 kDa, e indica que esta proteína está compuesta por sub unidades de 29 y 17 kDa unidas por puentes disulfuro; esta fracción proteica es excepcionalmente soluble tanto en agua como en soluciones salinas, y a diferencia de las

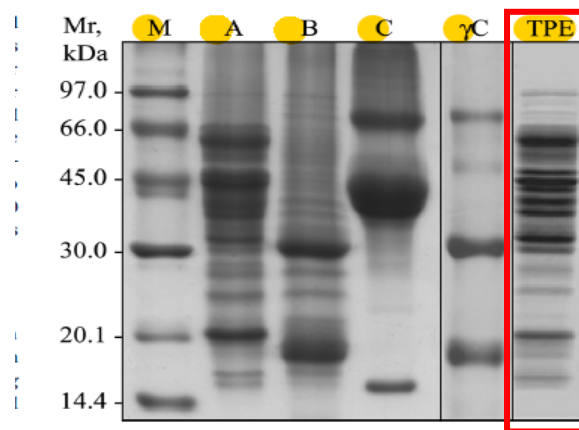
otras conglutinas del lupino, su punto isoelectrico está dentro del rango alcalino (7.9); esta glicoproteína presenta un contenido muy alto de azufre.

En el trabajo realizado por Muranyi *et al.* (2016) sobre extractos de semillas de *L. angustifolius*, reportan diferentes PM de las fracciones proteicas de la conglutina α , dependiendo del tipo de extracción (Tabla 4). Así, por ejemplo, en la extracción salina con precipitación inducida por dilución (pI pH 4-6), se apreciaron manchas en el gel de electroforesis en el rango de PM de 40-70 kDa, mientras que, con el mismo tipo de extracción, con precipitación inducida por (pI pH 7) se desarrollaron manchas en el rango de pM de 20-40 kDa. En el caso de la conglutina β , en el pI 5 encontraron en el gel un perfil bastante heterogéneo, aun cuando esta proteína no contiene enlaces disulfuro; especialmente las sub-unidades más grandes (54, 62, 72 kDa) mostraron manchas diseminadas en casi todo el rango de pH, lo cual se debería al alto grado de glicosilación, característico de muchas sub-unidades de conglutina β . Las sub-unidades de menor tamaño (15, 18, 21, 27, 31, 34, 38, 42 y 48 kDa) presentan menor glicosilación (Melo *et al.*, 1994 citados por Muranyi *et al.*, 2016). Por su parte, Capraro *et al.* (2014) determinaron el perfil electroforético de las proteínas aisladas del *L. albus*, obteniendo un perfil en el que se aprecian bandas entre 97 y 15 kDa, notándose mayor cantidad de bandas y más concentradas entre los 65 y 30 kDa (Figura 1 carril TPE).

Tabla 4: Principales características de las conglutinas del *L. angustifolius* en condiciones reductoras y no reductoras

Conglutina	Subunidad	pI	Peso molecular (kDa)	
			Condiciones no reductoras	Condiciones reductoras
α	Cadena α -ácida	5.1-5.8	62-74	40-70
	Cadena β -básica	6.7-8.6		20-24, 36
β		5.9-6.2	54-72	54-72
			34-48	34-48
		5.0-6.0	27-31	27-31
			15-21	15-21
δ	Subunidad grande	4.3	13	9
	Subunidad pequeña			4
γ	Subunidad pequeña	7.9	47	17
	Subunidad grande			29

Fuente: Muranyi *et al.* (2016).

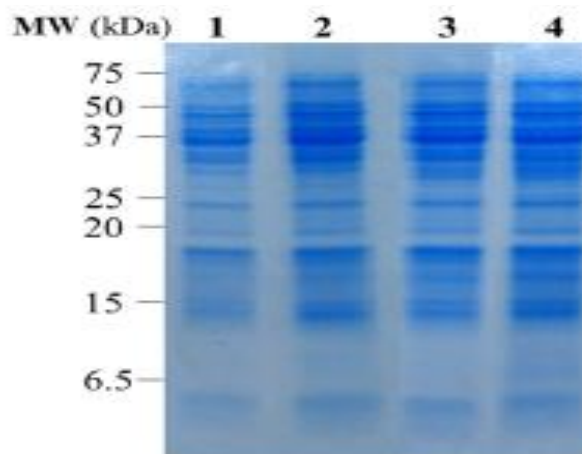


(M, Marcador de proteínas; A, Precipitado isoeléctrico; B, Precipitado isoeléctrico Zn^{2+} ; C, Ovoalbúmina; γ C, γ -conglutina de referencia; TPE, Extracto proteico total)

Figura 1: SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de las fracciones proteicas del *L. albus* obtenidas mediante precipitación isoeléctrica y precipitación isoeléctrica con Zn^{2+}

Fuente: Capraro *et al.* (2014).

Albe-Slabi *et al.* (2022) también reportan haber detectado bandas de 19-46 kDa atribuidas a subunidades de α -conglutina en *L. albus* (Figura 2).



(1, aislado proteico por precipitación isoeléctrica a pH 7; 2, aislado proteico por ultra centrifugación pH 7; 3, aislado proteico por precipitación isoeléctrica a pH 2; 4, aislado proteico por ultra centrifugación pH 2)

Figura 2: SDS-PAGE bajo condiciones reductoras en aislados proteicos de *L. albus* a diferentes valores de pH de extracción

Fuente: Albe-Slabi *et al.* (2022)

2.1.4 El desamargado del lupino

Villacrés *et al.* (2020a) explican que, las diferentes especies de lupino presentan un gran valor nutritivo, pero dependiendo de la especie, su uso está limitado por su alto contenido en alcaloides amargos y otros 20 factores antinutricionales, como el ácido fítico, los taninos, los nitratos y los inhibidores de la tripsina (IT), que tienen 21 efectos fisiológicos indeseables. Los alcaloides, en el caso de *Lupinus mutabilis*, se concentran en los granos, alcanzando entre 1,7 y 2,4 por ciento de la materia seca, aunque la variación puede ser mayor; Neves *et al.* (2016) indican que los componentes amargos de las semillas, alcaloides, varían desde 0.01 por ciento hasta 4 por ciento. Los alcaloides impiden emplear el lupino en alimentación animal o humana sin un previo tratamiento, y por ello su uso en la antigüedad fue limitado (Mera, s.f.). El alcaloide que se encuentra en mayor concentración es lupalina, seguido de esparteína, tetrahidrorombifolina, 4-hidroxilupalina, y 13-hidroxilupalina (Gross *et al.* 1988; Ortega-David *et al.* 2010; Castañeda *et al.* 2008). Según Keeler (1976), estas sustancias son importantes para la planta pues la protegen de fitopatógenos y animales herbívoros debido a su acción mutagénica y por su efecto tóxico en varios de estos organismos.

Se han desarrollado diversos estudios en los que se ha investigado varias formas de desamargado y su efecto sobre la composición química y las características sensoriales del grano desamargado. Jacobsen y Mujica (2006) indican que las semillas de *L. mutabilis* requieren de un tratamiento previo a su consumo, el cual, de acuerdo a su experiencia, consiste en remojar 3 kilogramos de grano en 18 litros de agua, cambiándola cada 6 horas durante 5 días. Asimismo, Jiménez-Martínez *et al.* (2001) explican que el desamargado incluye la hidratación la semilla, la cocción y los posteriores procesos de lavado con agua. Se ha reportado que la cocción en el caso del *Lupinus campestris* reduce el contenido en taninos y carbohidratos más de un 70 por ciento, en el caso de los alcaloides la cocción por tres horas fue responsable de un 56 por ciento de reducción del contenido de alcaloides quinolizidinicos (Jiménez-Martínez *et al.* 2001).

Villacrés *et al.* (2020a) aplicaron el tratamiento térmico-acuoso para el proceso de desamargado en *Lupinus mutabilis* Sweet. Este proceso comenzó con el remojo del grano a una temperatura inicial de 80°C durante 10 horas; se utilizó una proporción 1:3 de

grano:agua. A continuación, se realizó la cocción en agua a 91°C durante 1 h, seguida de un lavado con agua potable. Se utilizó una proporción de 1:15 (grano:agua) para el lavado. El lavado se realizó en dos etapas: primero con agua a 35°C durante 28 h seguido de agua a 18°C durante 45 h. Luego se secó en un horno de aire forzado a 60°C durante 8 h. Agrega que, los tratamientos que emplean el calor también ayudan a reducir la actividad del inhibidor de la tripsina y la actividad de la ureasa, pero disminuyen la calidad nutricional de los granos debido a la pérdida de nutrientes solubles tales como vitamina C, carotenoides y fenólicos totales. Simultáneamente a la eliminación de los compuestos tóxicos, el proceso de desamargado provoca en *Lupinus albus* la pérdida de otros nutrientes como minerales (Ertaş and Bilgiçli 2014).

Cortés- Avendaño *et al.* (2020) evaluaron el perfil y los niveles residuales de alcaloides de quinolizidina (QA) en 10 ecotipos de *Lupinus mutabilis* Sweet de diferentes áreas del Perú tras el proceso de desamargado acuoso. El desamargado lo realizó de la siguiente manera: las semillas fueron seleccionadas y puestas en remojo con una relación semilla-agua de 1:6 (p/v) durante 12 h a temperatura ambiente. A continuación, las semillas se cocinaron durante 1 h. Durante la cocción, el agua se cambió una vez cada 30 minutos. Tras la cocción, las semillas se lavaron bajo una corriente de agua durante 5 días. Después del lavado, las semillas se secaron a 50 °C durante 18 h. Encontró que sólo pequeñas cantidades de lupanina (media de 0,0012 g/100 g de MS) y esparteína (media de 0,0014 g/100 g de MS) permanecieron en las semillas tras el proceso de desamargado, y no se identificaron otros alcaloides. El proceso de desamargado acuoso redujo el contenido de alcaloides a niveles muy inferiores al nivel máximo permitido por la normativa internacional ($\leq 0,2$ g/kg MS).

Por su parte, Córdova-Ramos *et al.* (2020b) determinaron el efecto de los procesamientos (desamargado en agua, extrusión y secado por aspersión) sobre la composición química, el daño por calor y la digestibilidad in vitro de la proteína del lupino andino. El desamargado de los granos enteros, necesario para la eliminación de los alcaloides tóxicos, se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: remojo y lavado, los granos de lupino se hidrataron durante 12 horas a temperatura ambiente con una proporción de lupino:agua de 1:6 (p/v); las semillas hidratadas se hirvieron (semillas:agua, 1:3 p/v) durante 1 h cambiando de agua cada 30 min; luego, luego fueron remojadas en agua (semillas cocidas:agua 1:3 p/v) a temperatura ambiente durante 5 días, sustituyendo el agua cada día; posteriormente fueron secadas a 50 °C en un secador de bandejas de aire caliente durante 18 horas; y almacenado en la

oscuridad a temperatura ambiente hasta la molienda.) La eliminación completa de los alcaloides amargos se evaluó mediante un análisis sensorial de los granos, encontrando ausencia de sabor amargo en los en las semillas de lupino desamargadas confirmando la eliminación de los alcaloides. El desamargado acuoso generó, en este caso, una disminución de minerales y carbohidratos.

2.1.5 Usos de los lupinos

Los lupinos o la harina de lupinos son utilizados de muchas formas en diversas partes del mundo. Así, en Europa son usados en productos de panadería, pastelería, galletería, y salchichas; también en bebidas y como sustituto de la leche de vaca o soya, y las semillas son ampliamente usadas como snacks (Nadal et al. 2011; Hefle *et al.* 1994). Según Peeters *et al.* (2007), la inclusión del lupino en la harina de trigo fue introducida por primera vez en el Reino Unido (United Kingdom) en 1996 y en Francia a fines de 1997 para agregar proteína y fibra y mejorar la textura. La harina de lupino fue considerada primero como un suplemento para el pan y las galletas hace más de 20 años y ahora está siendo usada como una alternativa para la harina de soya por compañías que están en la búsqueda de ingredientes alimentarios no modificados genéticamente.

Villacrés *et al.* (2006) describen las siguientes formas de consumo del chocho desamargado:

- **Carne vegetal de chocho.** Pasta blanca, obtenida por fermentación sólida del chocho desamargado con esporas del moho pertenecientes al género *Rhizopus* y a la especie oligosporus. Este producto frito presenta un sabor agradable y característico a carne. Almacenadas en fundas de polietileno al vacío tiene una duración de 12 días en refrigeración.
- **Chocho germinado.** El grano germinado aporta nutrientes más digeribles al organismo. El tiempo de vida útil del grano germinado envasado en fundas de polietileno con CO₂ y almacenado en refrigeración es de seis días.
- **Ají con chochos.** Se prepara una pasta de tomate con ají, sal, ácido ascórbico, etc., a la cual se incorporan los chochos con cebolla en una proporción de 12 por ciento. Se ajusta el pH final a 3 con una solución de ácido cítrico al 50 por ciento; luego se envasa y pasteuriza a 80 °C por 20 min. Con la adición de sorbato de potasio al 0.2

por ciento seguido de la pasteurización, se puede extender la vida útil del producto hasta 180 días en condiciones ambientales (17 °C, 50 por ciento HR).

- **Leche de chocho.** Producto semejante en apariencia y composición química a la leche de vaca. Se obtiene por extracción acuosa del grano con adición de proteína hidrolizada y homogel como estabilizante. Este producto no contiene colesterol, glucosa y casi ningún factor alérgico.
- **Yogur de chocho.** Se obtiene a partir de leche de chocho; el procesamiento es similar a la leche de vaca: pasteurización de la leche a 75 °C por 15 min., enfriado a 42 °C, inoculación con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. La fermentación se lleva a cabo a 42 °C durante tres a cuatro horas. Luego se enfría y homogeniza, y se le agrega mermelada natural de frutas y chocho picado para mejorar el sabor, la consistencia y la aceptabilidad del producto final.

2.1.6 Alergenicidad del lupino

La alergia alimenticia es una respuesta inmunológica anormal desencadenada por la ingesta de ciertos alimentos. Ciertas proteínas alimenticias no tóxicas, sin efectos adversos en la mayoría de las personas, producen síntomas de alergia en cierta población sensible. Más del 90 por ciento de las alergias alimenticias se derivan de 8 tipos de alimentos, entre los que se incluyen: leche de vaca, huevos, pescado, crustáceos (camarón, cangrejo, langosta, etc.), maní, soya, frutos secos (almendra, nuez, anacardo o marañón, etc.), y trigo (Huang *et al.* 2013). La FAO/OMS (2006) reportó que, sobre la base de encuestas epidemiológicas, la Organización Mundial de Alergias (World Allergy Organization) estimó la existencia de aproximadamente 220 a 250 millones de personas que sufren de alergias alimenticias; indica además las prevalencias estimadas de alergias alimenticias de uno a tres por ciento en adultos y de cuatro a seis por ciento en niños.

Guillamon *et al.* (2010) mencionan que los reportes de reacciones alérgicas al lupino después de la ingestión han ido aumentando con el uso creciente de proteínas de altramuza en productos dietéticos, ya sea como primaria alergia al altramuza o como resultado de la reactividad cruzada con otras legumbres, especialmente el maní.

Hefle *et al.* (1994) indican que el altramuza (*Lupinus albus* L.) se utiliza cada vez más en los alimentos debido a su valor nutricional y que la soya se sustituye con frecuencia con altramuza

para producir productos libres de OGM. Incluso para producir alimentos libres de gluten, se utiliza altramuz (IFC 2016). Sin embargo, ciertas proteínas de lupino son alergénicas. Así, Crespo *et al.* (2001) mencionan que la ingestión de harina de semilla de altramuz ha sido reportada como causa de reacciones alérgicas en pacientes sensibilizados al maní. Dooper *et al.* (2009) indican que se cree que el desarrollo de la alergia a lupino en pacientes alérgicos a cacahuete ocurre como resultado de la reactividad cruzada entre las proteínas de lupino y cacahuete. Mientras que Ecker y Cichna (2012) explican que puede haber reacciones cruzadas con otras leguminosas como maní y soya, y que, por lo tanto, el altramuz fue catalogado como alérgeno de alimentos a fines del 2006 y está sujeto a los requisitos de etiquetado.

La alergia al altramuz ha sido principalmente reportada en personas alérgicas a otras legumbres, particularmente al maní. Peeters *et al.* (2007) indican que la alergia al altramuz podría ser consecuencia de una reacción cruzada después de una sensibilización al maní o a otras legumbres, y que las alergias al altramuz no han sido completamente caracterizadas. Agregan que, las vicilinas, también, denominadas globulinas 7S, son la mayor fuente de proteínas en la mayoría de las semillas de legumbres que podrían contribuir a la reacción cruzada entre legumbres.

Las prolaminas son una superfamilia de las proteínas que ha sido descrita en las plantas vasculares y que contiene tanto miembros alergénicos como no alergénicos. Son un grupo dominante de las proteínas de almacenamiento en cereales y otros miembros de herbáceas. Alergias debidas a las prolaminas de cereales no ocurren frecuentemente y han sido estudiadas principalmente en el trigo. Esta familia de proteínas contiene una pequeña secuencia homóloga aparte del esqueleto de cisteína, pero son bastante similares en su estructura α -helicoidal. Esta estructura es altamente estable, tanto a la desnaturalización térmica como a la proteolítica, lo cual podría contribuir a su alergenicidad (Radauer and Breiteneder 2007).

En los individuos con alergia al altramuz, se ha sugerido que las fracciones de globulina son alérgenos importantes. Se han llevado a cabo muchos estudios para identificar qué fracción o fracciones específicas del lupino son responsables de provocar la respuesta inmunitaria alérgica. Los primeros estudios sobre el aislamiento y la caracterización de los cuerpos proteicos de *L. angustifolius* indicaron que la γ -conglutina reaccionaba con los anticuerpos

monoclonales, pero la proteína de almacenamiento rica en azufre 2S (δ -conglutina) no producía ninguna reacción. El análisis del suero de un paciente que falleció tras comer pan de “hot dog” mostró un alto nivel de IgE anti-cacahuete. Las proteínas de 38 y 15 kDa fueron las responsables de la reacción cruzada con la IgE anti-cacahuete del paciente, y un suero policlonal anti-lupino detectó tres bandas proteicas principales de 65, 50 y 40 kDa en todos los extractos que contenían lupino. Estudios más recientes reportados desde 2005 sostienen que la γ -conglutina es el principal alérgeno del lupino y que también se observó que los polipéptidos de la γ -conglutina producen una reacción cruzada con la IgG específica a la subunidad básica de Ara h 3, un conocido alérgeno del cacahuete de la familia de las globulinas 11S. También se observó que este polipéptido de 43 kDa, que podría coincidir con la γ -conglutina no reducida, producía una reactividad cruzada con la IgE anti-cacahuete. (Nadal *et al.* 2011).

2.2 ANTIOXIDANTES

2.2.1 ROS, antioxidantes, actividad antioxidante y capacidad antioxidante

El oxígeno es la molécula clave que permite el metabolismo aeróbico en los organismos vivos. Sin embargo, su alta reactividad, también daña o interrumpe las biomoléculas al producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rawson *et al.* 2014). El cuerpo humano produce especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, por muchos sistemas enzimáticos a través del consumo de oxígeno. En pequeñas cantidades, estas ROS pueden ser beneficiosas como transductores de señal y reguladores de crecimiento. Sin embargo, durante el estrés oxidativo, grandes cantidades de estas ROS pueden favorecer algunas enfermedades humanas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. Según Fernández-Pachón (2006), el daño oxidativo se relaciona con el origen y desarrollo de ciertas enfermedades multifactoriales de carácter crónico, como la oxidación de las LDL y la enfermedad cardiovascular, el daño oxidativo al ADN y el cáncer, y la oxidación de las proteínas de las lentes oculares y la alteración de la visión. Por lo tanto, se requieren constantemente ciertas cantidades de antioxidantes exógenos para mantener un nivel adecuado de antioxidantes con el fin de equilibrar las ROS. Por esta razón, los organismos vivos han desarrollado una amplia y compleja red de moléculas y enzimas antioxidantes, capaces de proteger componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas

y lípidos del daño oxidativo (Moo-Huchin *et al.* 2015). La ingesta de alimentos ricos en sustancias antioxidantes como vitaminas C y E, carotenoides o compuestos fenólicos, previene o disminuye el desarrollo de estas enfermedades. Se cree que la dieta aumenta la defensa antioxidante del organismo evitando el daño oxidativo (Fernández-Pachón 2006).

Según una definición general, los antioxidantes pueden ralentizar o prevenir la oxidación de otras moléculas mediante la eliminación de los intermediarios de radicales libres. Contrariamente, un pro-oxidante es una sustancia tóxica que causa daño a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que dan lugar a patologías (Rawson *et al.* 2014). Pokorny *et al.* (2001) indican que, la denominación correcta de estas sustancias es inhibidores de la oxidación, pero en la actualidad se les denomina principalmente antioxidantes, y engloba a un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. El mecanismo más importante consiste en su reacción con radicales libres lipídicos y conlleva a la formación de productos inactivos. Rawson *et al.* (2014) indican que, por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidativa, por ejemplo, la peroxidación lipídica, y que, los fenoles son los principales componentes antioxidantes de los alimentos. La actividad antioxidante de los polifenoles se asocia a diversos mecanismos de acción, considerándose la elevada reactividad de los fenólicos frente a los radicales libres activos como el mecanismo principal más común. Agrega que, los autores quieren distinguir entre la actividad antioxidante y la reactividad: la actividad antioxidante proporciona información sobre la duración de la acción antioxidante; la reactividad caracteriza la dinámica inicial de la antioxidación a una determinada concentración de un antioxidante o de una mezcla compleja de antioxidantes.

Los antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de dos maneras: eliminando los radicales libres, donde el compuesto se describe como un antioxidante primario, o por un mecanismo que no implica la eliminación directa de radicales libres, donde el compuesto es un antioxidante secundario. Los antioxidantes primarios son eliminadores activos de radicales, donantes de hidrógeno o rompedores de reacción en cadena, por lo tanto, detienen las reacciones en cadena, retrasan o evitan la etapa de iniciación, o inhiben la etapa de propagación. Los antioxidantes secundarios funcionan por varios mecanismos, incluida la unión de iones metálicos, la eliminación de oxígeno, la conversión o descomposición de hidroperóxidos a especies no radicales, inhibiendo la formación de reactivos oxidantes, la absorción de radiación UV o la desactivación de oxígeno singlete. Normalmente, los

antioxidantes secundarios exhiben actividad antioxidante solo cuando un segundo componente menor está presente. Por ejemplo, los agentes secuestrantes como el ácido cítrico son efectivos solo en presencia de iones metálicos, y los agentes reductores como el ácido ascórbico son efectivos en presencia de tocoferoles u otros antioxidantes primarios (Rawson *et al.* 2014).

MacDonald-Wicks *et al.* (2006), citados por Rawson *et al.* (2014), han distinguido los términos actividad antioxidante y capacidad antioxidante. La actividad antioxidante se refiere a la velocidad constante de una reacción entre un antioxidante específico y un oxidante específico, mientras que la capacidad antioxidante es una medida de la cantidad (en moles) de un radical libre dado eliminado por una muestra.

2.2.2 Métodos para determinar la capacidad antioxidante

Pokorny *et al.* (2001) indican que se puede realizar una valoración de la actividad antioxidante a través de la pérdida de lípidos que suponen el material de partida, tales como, los ácidos grasos o triglicéridos, o la formación de productos de oxidación, pero que, en la práctica, la medida de la formación de productos de reacción es un método mucho más sensible para evaluar la oxidación. Sin embargo, indica, no es una tarea fácil ya que se forma una mezcla compleja de productos de reacción, y que las cantidades relativas de los diferentes productos dependen de un gran número de variables que incluyen la temperatura, el contenido de iones metálicos y de otros componentes presentes en el alimento, tales como el agua. Por otro lado, la diversidad química de los antioxidantes naturales (AOX) hace que sea difícil de separar, detectar y cuantificar antioxidantes individuales a partir de una matriz alimentaria/biológica compleja. Además, el poder antioxidante total es a menudo más significativo para evaluar los efectos benéficos sobre la salud debido a la acción cooperativa conjunta de especies antioxidantes individuales. Los ensayos antioxidantes pueden clasificarse ampliamente como la transferencia de electrones (ET) y ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). Los resultados obtenidos son difícilmente comparables debido a los diferentes mecanismos, potenciales redox, pH y dependencias de disolventes, etc. (Apak *et al.* 2013; Shahidi y Zhong 2015).

Se han desarrollado varios métodos para medir actividad antioxidante total, basada en diferentes mecanismos de reacción como la capacidad antioxidante equivalente de Trolox

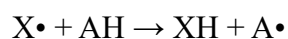
(TEAC), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), parámetro antioxidante reductor del ion férrico (FRAP), 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), y parámetro antioxidante atrapante de radicales totales (TRAP) (Mahattanatawee *et al.* 2006).

Rawson *et al.* (2014) recalcan que, dependiendo de las condiciones de los métodos analíticos de medición, diferentes resultados se pueden obtener para el mismo tipo de alimento. Además, indica que las condiciones del análisis, del sustrato y la concentración de antioxidantes deben simular el alimento o el sistema biológico. Agrega que, existe una amplia gama de métodos disponibles que difieren en lo que respecta al mecanismo, al oxidante, al objetivo, a las condiciones de reacción y a la expresión de resultados. De hecho, algunos autores han tratado de seleccionar el mejor método, pero no se ha logrado un consenso debido a limitaciones, como la determinación de antioxidantes hidrófilos, dificultad para determinar el punto final, la sensibilidad a la luz de los iniciadores, pH del análisis, interferencias alimentarias y el uso de diferentes estándares para expresar resultados. No existe un método con todas las ventajas. El método ideal sería un ensayo único, rápido y sencillo. Sin embargo, esto no reflejaría la complejidad de las interacciones de los antioxidantes dentro de las matrices alimentarias. Por lo tanto, se recomienda combinar ensayos para estudiar la actividad antioxidante de los alimentos. Por ejemplo, los carotenoides son buenos inhibidores de los radicales peroxilo en comparación con los compuestos fenólicos, pero estos son excepcionales destructores del oxígeno singulete.

La mayor parte de los métodos de medida de la actividad antioxidante miden solamente compuestos solubles en agua debido a las naturalezas hidrofílicas de las especies reactivas y de los sustratos oxidables que emplean. Algunos ensayos pueden adaptarse para medir antioxidantes lipofílicos: ORAC, ABTS y el ensayo TRAP (Fernández-Pachón 2006).

Rawson *et al.* (2014) destacan los ensayos basados en la transferencia de hidrógeno (HAT, Hydrogen Atom Transfer) y en la transferencia de electrones (SET, Single Electron Transfer), e indica que estos dos mecanismos generalmente ocurren simultáneamente y la prevalencia de uno de ellos depende de la estructura del antioxidante y del pH.

Los métodos HAT miden la capacidad de un antioxidante (AH, un donante de hidrógeno) para inactivar los radicales libres mediante la donación de hidrógeno.



Entre estos métodos se tiene: ORAC (Oxygen Radical Absorbancy Capacity), TRAP (Total Radical Trapping Power). Estos métodos HAT dependen del solvente, el pH, y son afectados por la presencia de agentes reductores como los metales. Las reacciones de HAT son generalmente bastante rápidas y la cuantificación deriva de las curvas cinéticas.

En la mayoría de los métodos de transferencia de electrones (ET) la acción antioxidante se simula con una prueba de potencial redox adecuada, es decir, los antioxidantes reaccionan con una sustancia fluorescente o coloreada (agente oxidante) en lugar de radicales peroxilo. Los ensayos espectrofotométricos basados en ET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color (ya sea un aumento o disminución de la absorbancia de la prueba a una longitud de onda dada) se correlaciona con la concentración de antioxidantes en la muestra. Entre estos métodos se tiene: ensayos de decoloración ABTS (2,2'-zino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)/TEAC (Trolox-equivalent antioxidant capacity) y DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl); mientras que, en el método CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) se produce un incremento en la absorbancia a una determinada longitud de onda, debido a que el antioxidante reacciona con un reactivo cromógeno (Apak *et al.* 2013).

a. Método PR (Poder Reductor)

Este análisis se basa en el principio de que las sustancias que tienen un potencial reductor reaccionan con el ferrocianuro de potasio (Fe^{3+}) para formar ferricianuro de potasio (Fe^{2+}). Este último reacciona con el cloruro férrico para formar el complejo férrico-ferroso que tiene un máximo de absorbancia a 700 nm (Bhalodia *et al.* 2013).

b. Método ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid)

Kuskoski *et al.* (2005) indican que, los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también eletroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de

naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. Además, el radical ABTS.+ es uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y coherentes; tiene la ventaja de tener una buena solubilidad, y que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm. Kuskoski *et al.* (2003) concluyen que, en el caso de la medida en frutas este ensayo se puede realizar en un tiempo de un minuto, mientras que con el método DPPH se requiere de un tiempo de 60 minutos.

Según la metodología desarrollada por Re *et al.* (1999) y descrita por Kuskoski *et al.* (2005), el radical ABTS•+ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS•+ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 ($\pm 0,1$) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas (antocianos) se diluyen con etanol. Luego, a 980 μL de dilución del radical ABTS•+ generado se le determina la absorbancia a 754nm a 30°C , se añade 20 μL de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la absorbancia a 754 nm pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos, hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a concentraciones de 0 a 15 μM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, o se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C), en este último caso por tratarse de alimentos (Kuskoski *et al.* 2005).

c. Método DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Kuskoski *et al.* (2005) indican que este método fue desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995); se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH•, por antioxidantes. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa. Con su electrón impar, el DPPH• puede estabilizarse aceptando un electrón o un radical de hidrógeno de una molécula antioxidante, como un grupo sulfhidrilo. El DPPH• es conocido por su color violeta intenso y su fuerte absorbancia a 517 nm cuando se disuelve en etanol a concentraciones entre 1 mM y 22,5 μM ; esta absorbancia disminuye con la decoloración del DPPH• que acompaña el emparejamiento el electrón solitario. La

absorbancia a 517 nm del DPPH• es estable entre pH 5,0 y 6,5, pero es sensible a condiciones altamente alcalinas que pueden ser amortiguadas por el acetato (Rawson *et al.* 2014). Kuskoski *et al.* (2005) explican que, con modificaciones, el método descrito por Kim *et al.* (2002), se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH• 100 µM (3,9 mL) disuelto en metanol al 80%, a la longitud de onda de 517 nm. Se añade 0,1 mL de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizan antes de añadir la muestra (Ao) y pasados los 30 y 60 minutos (Af). A continuación, los porcentajes de DPPH• que permanecen en estado estacionario se plotean frente al antioxidante correspondiente, lo que da lugar a un gráfico (curva de calibrado, obtenida por regresión lineal) que permite calcular la concentración efectiva para una reducción del 50 por ciento del DPPH•. Muchos investigadores han elegido un único tiempo para cuantificar la eficacia de eliminación de radicales libres estables DPPH-, siendo la elección más común de 30 min (varía de 20 a 60 ó 90 min) y se comparan estos valores con un control de disolvente para expresar la inhibición del radical libre estable DPPH (Fórmula 1) (Rawson *et al.* 2014).

$$\text{Inhibición (\%)} = ((A_{519} \text{ Control} - A_{519} \text{ Muestra}) / A_{519} \text{ Control}) \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (µM/g de muestra peso fresco). El antioxidante sintético de referencia Trolox, a una concentración de 0,08-1,28 mM en disolución de metanol al 80%, se ensaya en las mismas condiciones, expresándose los resultados en TEAC (actividad equivalente a Trolox) y VCEAC (Actividad equivalente a vitamina C).

Rawson *et al.* (2005) señalan que, esta metodología de barrido de radicales libres estables DPPH• puede utilizarse para estudiar los antioxidantes polares y no polares como el ácido ascórbico y el butilhidroxianisol (BHA) o hidroxitolueno butilado (BHT), respectivamente. Por ejemplo, el metanol es el disolvente preferido para los flavonoides no glicosilados que son considerablemente menos solubles en agua que las respectivas gliconas, mientras que el DMSO (dimetilsulfóxido) es altamente polar, muy estable, miscible con los disolventes orgánicos más comunes y disuelve hidrocarburos aromáticos e insaturados, compuestos orgánicos de nitrógeno, compuestos orgánicos de azufre y muchas sales inorgánicas, pero no disuelve los hidrocarburos saturados.

d. Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Mide la capacidad de reducción del hierro (FRAP, del inglés Ferric Reducing Antioxidant Power). Este método se desarrolla bajo condiciones ácidas (pH 3.6). En presencia de antioxidantes, la forma férrica del compuesto hierro-tripiridyl-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) se reduce a la forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ). El compuesto Fe^{2+} -TPTZ (forma ferrosa) produce una coloración azul intensa que tiene una absorción máxima de 593 nm. Los resultados del ensayo FRAP, se ha visto que correlacionan con los antioxidantes presentes en plantas o frutos (Benzie y Strain 1996 y Benzie y Devaki 2017 citados por Benítez-Estrada 2020). Rawson *et al.* (2014) indican que, el ensayo FRAP podría medir directamente el "poder antioxidante total" de una mezcla compleja con potenciales efectos sinérgicos que no serían evidentes cuando se analizan los componentes por separado. El ensayo FRAP se basa en la transferencia de un solo electrón por parte de un antioxidante para reducir el ion férrico a ferroso; cuando el complejo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) se reduce a su homólogo ferroso, el complejo absorbe a 593 nm con un color azul intenso.

e. Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Sobre la base de principios químicos, el ensayo ORAC está estrechamente relacionado con las funciones biológicas de los antioxidantes que rompen cadenas, se ha utilizado ampliamente para evaluar la actividad antioxidante en frutas y verduras, y, por lo tanto, es útil para la comparación de datos de otros estudios. Este método mide la capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC, del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity). En este ensayo, los radicales $\text{ROO}\cdot$ generados por un iniciador de radicales libres, reaccionan con una sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente; el antioxidante compite mediante un mecanismo de transferencia de hidrogeniones con la sonda fluorescente, manteniéndose la fluorescencia. El resultado se obtiene calculando el área bajo la curva de fluorescencia, y se expresa como equivalentes micromolares de Trolox ($\text{ET } \mu\text{mol}$) por mL (para líquidos) o por g (para productos sólidos) (Zapata *et al.* 2014, citados por Benítez-Estrada 2020).

Según Rawson *et al.* (2014), no existe una respuesta única y sólida a la pregunta de qué índice de actividad antioxidante es más relevante; la reactividad de las muestras de alimentos

puede ser de interés en determinadas condiciones. Indica también que, mientras tanto, la información sobre la reactividad de los alimentos y los polifenoles naturales individuales sigue siendo bastante escasa y contradictoria.

Cada método tiene ventajas e inconvenientes. Los métodos indirectos (DPPH, ABTS) se utilizan con más frecuencia que los métodos directos. Los métodos directos son más adecuados en principio, especialmente los basados en el modelo de la reacción en cadena controlada. Además, suelen ser más sensibles. La desventaja de los métodos directos es que la mayoría requieren mucho tiempo y su aplicación requiere una gran experiencia en cinética química. Ou et al. realizaron un análisis a gran escala en vegetales utilizando dos ensayos in vitro diferentes, FRAP y ORAC, y obtuvieron capacidades antioxidantes muy diferentes de estos métodos; en su estudio, las capacidades antioxidantes determinadas por los ensayos FRAP y ORAC sólo estaban débilmente correlacionadas. En consecuencia, los métodos directos no son adecuados para el análisis rutinario de productos naturales. Por otro lado, por regla general, los métodos indirectos bien desarrollados, como los ensayos DPPH y ABTS, son más productivos y fáciles de manejar; suelen proporcionar información sobre la capacidad de los productos naturales para eliminar radicales libres estables, por ejemplo, DPPH y ABTS+ (Rawson *et al.* 2014).

2.2.3 Capacidad antioxidante en el lupino

Rawson *et al.* (2014) mencionan que varios estudios epidemiológicos han asociado la ingesta elevada de productos vegetales ricos en antioxidantes con la reducción del riesgo de muchas enfermedades crónicas, como la aterosclerosis y el cáncer. La protección que proporcionan las frutas y las verduras contra varias enfermedades se ha atribuido a diversos antioxidantes presentes en estas especies, como la vitamina C, la vitamina E, el α -tocoferol, el β -caroteno y los compuestos polifenólicos. Czubinski *et al.* (2021) sostienen que en las semillas de lupino abundan compuestos que muestran efectos beneficiosos para la salud, como tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, compuestos fenólicos, y oligosacáridos. Lampart-Szczapa *et al.* (2003) sostienen que el lupino es una fuente potencial de componentes con actividad antioxidante. Villacrés *et al.* (2020b) mencionan que estos efectos se han descrito en algunas especies de altramuces, como *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius*, y en otras especies silvestres, pero que hay poca información sobre *Lupinus mutabilis*, a pesar de ser una de las especies más comunes por su capacidad de crecer en suelos pobres y en

condiciones climáticas extremas. Por otro lado, Khan *et al.* (2015) mencionan que se han reportado diversas investigaciones sobre especies de lupino, las que han estado centradas en la composición nutricional, la distribución geográfica, los posibles usos, la alergenicidad y las propiedades nutraceuticas asociadas con las proteínas, pero que, sin embargo, hay una carencia de información en lo que se refiere a la composición fitoquímica, el potencial antioxidante y la actividad biológica, por lo que es imperativo investigar en estos aspectos y en sus aplicaciones industriales.

Vollmannova *et al.* (2021) indican que, las semillas de altramuz blanco tienen un interesante contenido de sustancias biológicamente valiosas con un alto potencial antioxidante, como los taninos y los flavonoides. Asimismo, Karamać *et al.* (2018) explican que, las semillas de altramuz contienen cantidades significativas de fitoquímicos con potencial para promover la salud, como compuestos fenólicos, fitoesteroles, tocoferoles y escualeno. Chirinos-Arias (2015) informa que, el tarwi es la única especie del género *Lupinus* que posee en sus semillas isoflavonas (un tipo de flavonoides) que son conocidas por sus propiedades antioxidantes, pero que, sin embargo, no hay estudios realizados directamente en tarwi que comprueben su actividad antioxidante. Por su parte, Berghout *et al.* (2015) mencionan que, aparte de su valor nutricional, el lupino andino es una interesante fuente de compuestos bioactivos importantes para la salud. Gálvez-Ranilla *et al.* (2009) indican que en el lupino se encuentran flavonas e isoflavonas, compuestos con una alta actividad antioxidante; esta actividad antioxidante depende de la variedad y el genotipo (Czubinski *et al.* 2019).

Villacrés *et al.* (2020b) reportan en variedades de altramuz amargo valores de fenoles totales de 1127,87 mg/100 g, así como carotenoides totales (3,09-3.97 µg/g) y ácido ascórbico (9,6 mg/100 g) e indica que el contenido de fenoles totales, carotenoides y ácido ascórbico fue afectado por el proceso de desamargado. Por su parte, Córdova-Ramos *et al.* (2020b) estudiaron el efecto del proceso tecnológico de extrusión sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales de tres genotipos de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) andino (Altagracia, Andenes y Yunguyo); antes del proceso de extrusión, obtuvo valores de capacidad antioxidante del lupino andino amargo por DPPH (5,09 - 5,62 µmol Trolox/g b.s.) y ABTS+ (146,72 - 167,87 µmol Trolox/g b.s.), los cuales, indica, fueron diferentes para cada genotipo y que además estos valores se encuentran por encima de los resultados obtenidos por Martínez-Villaluenga *et al.* (2009), quienes encontraron valores de capacidad antioxidante por DPPH y ABTS+ dentro de los rangos de 2,83 - 3,09 y 47,0 - 71,4 µmol

trolox/g b.s. respectivamente, en diferentes semillas crudas de genotipos de *L. angustifolius* y *L. albus*. Agrega que, después del proceso de desamargado, los valores de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos del lupino amargo se redujeron, mientras que, la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles de las muestras de lupino desamargadas y extruidas fueron muy similares y no existieron diferencias significativas entre ellos ($p \geq 0,05$). Asimismo, Gálvez-Ranilla *et al.* (2009) encontraron valores de capacidad antioxidante por DPPH de 0,82 - 1,6 $\mu\text{mol Trolox/g b.h.}$ en diferentes genotipos de *L. mutabilis* Sweet.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente estudio se desarrolló en las siguientes instalaciones de la Universidad Nacional Agraria La Molina:

- Laboratorios de la Facultad de Industrias Alimentarias - FIAL: Instrumentación e Investigación, Análisis Físicoquímicos, Biotecnología, Ingeniería de Alimentos, Microbiología de Alimentos.
- Laboratorios del Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS) de la Università degli Studi di Milano. Milan, Italia.

Parte de la investigación, en lo relacionado con las pruebas de electroforesis, determinación de tocoferoles, carotenoides y capacidad antioxidante, se realizó en los laboratorios citados de la Università Degli Studi Di Milano, en Milán – Italia.

3.2 MUESTRAS

Se trabajó con 20 ecotipos de lupino (*Lupinus mutabilis*) procedentes de las diversas zonas de producción del Perú (Tabla 5, Figura 3), recolectadas por el Programa de Leguminosas de la Facultad de Agronomía de la UNALM. . Las muestras testigo fueron proporcionadas por la doctora Alyssa Hidalgo Vidal, del Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS) la Università Degli Studi Di Milano, en Milán – Italia.

3.3 REACTIVOS

- Ácido acético 10 % (v/v)
- Ácido clorhídrico (SIGMA ALDRICH)
- Ácido fosfórico al 85% (p/v).
- Ácido tricloroacético (TCA) al 10%
- Acrilamida

Tabla 5: Relación y procedencia de los ecotipos de *Lupinus mutabilis* usados en la investigación

Ecotipo	Procedencia
Alta gracia	La Libertad
Andenes 80	Ancash
Andenes-INIA	Cuzco
Cajamarca	Cajamarca
Cholo fuerte	Ancash
Compuesto blanco semiprecoz	Junín
H6 INIA B/N	Junín
H6 INIA B/P	Junín
Huallanca	Ancash
Huánuco 1	Huánuco
Huánuco 2	Huánuco
Lircay	Huancavelica
Moteado Beige	Junín
Pallasca	Ancash
Patón Grande	La Libertad
Puno 2 Blanquita	Puno
Yanamuclo 008-1	Junín
Yanamuclo 008-3	Junín
Yanamuclo-PLGO	Junín
Yunguyo	Puno

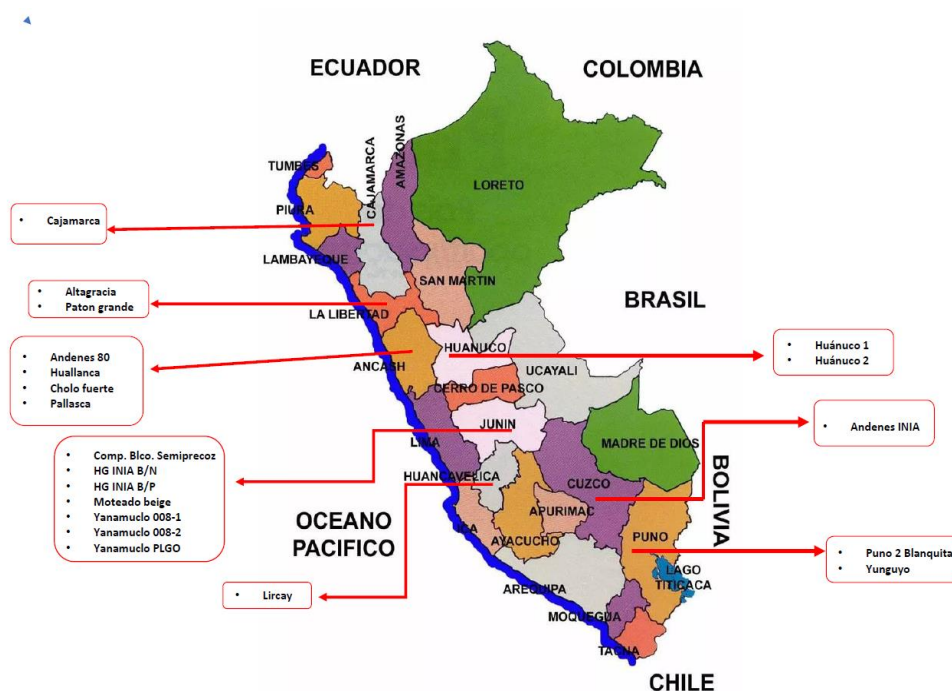


Figura 3: Distribución geográfica de los ecotipos de tarwi analizados

- Agua desionizada
- Alcohol etílico al 30 % (v/v)
- Azul brillante de Comassie R250 (BioRad) (0.05 % p/v)
- Azul de bromofenol (0.004%) (SIGMA ALDRICH)
- Azul de bromofenol (5% v/v) (SIGMA ALDRICH)
- BSA (Bovine Serum Albumin) BSA (THERMO)
- Buffer Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 19.2 mM, SDS 0.1 % (SIGMA)
- Carbonato de sódio (SIGMA ALDRICH)
- Cloruro de sodio (10 g/L) (SIGMA ALDRICH)
- DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazida). Sigma-Aldrich, EE.UU.
- Estándares para carotenoides. Sigma, St. Louis, MO, USA.
- Estándares para tocoles. α -tocoferol (Fluka BioChemika, Buchs, Switzerland) y β -tocoferol (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Etanol
- Ferrocianuro de potasio
- Gel code Blue Stain Reagent (THERMO)
- Glicerol (10 % v/v)
- Glicina (SIGMA ALDRICH)
- Hexano - C₆H₁₄ (MERCK)
- Hexano:acetato de etilo (9:1 v/v)
- Hidróxido de sodio – NaOH (MERCK)
- Hidróxido de potasio (600 g/L).
- Marcadores protéicos, 14 a 94 kDa (THERMO)
- Metanol (CH₄OH) al 80% (v/v)
- Mezcla hexano:alcohol isopropílico (90:10 v/v)
- N, N' metilenbisacrilamida
- Nitrógeno (gas)
- Persulfato de amonio al 5% (THERMO)
- Pirogalol etanólico (60 g/L)
- Reactivo ABTS+
- Reactivo Folin Ciocalteu (MERCK)
- Reactivo FRAP
- Reactivo Trolox
- SDS 20% (v/v) (Sodium Dodecyl Sulfate) – Lauryl - Sequanal Grade (THERMO)

- Solución de tampón NaCl 0.5 M
- Solución tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 9.00, + 0.5 M NaCl)
- Sulfato de cobre pentahidratado - CuSO₄.5H₂O (SIGMA)
- Tampón de acetato 0.3 M pH 3.6.
- Tampón de fosfato a pH 6,6
- Tampón Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, en SDS 0.1% (p/v)
- Tartrato de Sodio (SIGMA)
- TEMED (Tetra-methyl-ethylenediamine) (THERMO)
- Tricloruro de hierro FeCl₃
- β-mercaptoetanol (5 % v/v) (SIGMA)

3.4 MATERIALES

- Balón para evaporar al vacío
- Bomba de cromatógrafo L-2130 Elite LaChrom. VWR, Hitachi, Japan.
- Bombilla de aspiración
- Columna cromatógrafo Adamas® C18-AQ 5 μm 4.60 mm × 250 mm
- Columna Alltima SI, 250 x 4.6 mm, 5 mm. Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA.
- Columna de horno de cromatógrafo a 20 °C L-2300 Elite LaChrom. VWR, Hitachi, Japan.
- Columna de protección de cromatógrafo Alltima SI, 7.5 x 4.6 mm, 5 mm. Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA.
- Cubetas de plástico con una trayectoria óptica de 1 cm.
- Detector de arreglo de diodo L2450 Elite LaChrom. Merck, Hitachi, Japan.
- Detector fluorimétrico. Jasco 821 FP Intelligent Spectrofluorometer. Japan.
- Filtro de membrana de PTFE de 0.45 μm
- Fiolas y probetas de 10, 20, 50, 250 y 1000 l.
- Goteros de 1, 0.5 y 0.1 ml
- Matraz de Erlenmeyers de 10 ml, 25 ml, 50 ml y 250 ml.
- Membranas de PTFE de 0.22, 0.45 μM. Diana Beck Scientific, Angera, Italy.
- Microjeringas
- Micropipetas
- Micropipetas de 5 μl, 10 μl, 20:200 μl y 00:1000 μl

- Papel aluminio
- Pera de decantación
- Pipetas de 5 ml, 10 ml, 20 ml
- Pizeta
- Precolumna cromatógrafo C18 5 μm 4.60 mm \times 10.0 mm (Sepachrom SRL, Rho, Italy)
- Probeta graduada de 20 ml
- Tubos con tapón de rosca
- Tubos Eppendorf
- Vaso pp. de 250 ml
- Viales para micro pipetas

3.5 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Agitador de vórtice Mn1Minishaker (IKA, Alemania)
- Balanza analítica
- Baño termostato (EN.CO DC30 Haake)
- Baño termostato (MR Hei-Standard Heidolph, Alemania.
- Centrifuga (8°C). Centrikon K24 (Kontron Instruments, Bletchley, UK)
- Colorímetro Chroma Meter II. Minolta Italia SpA, Milan, Italy.
- Cromatógrafo HPLC
- Equipo de electroforesis Mini Protean II (Biorad)
- Espectrofotómetro de doble haz (modelo V650 Jasco, Japón)
- Espectrofotómetro Beckman DU-62
- Evaporador al vacío. Laborota 4000 rotavapor (Heidolph, Milan, Italy)
- Extractor Soxhlet para grasa bruta
- Molino Grindomix GM 200. Retsch GmbH, Germany.

3.6 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Se determinó el peso de 100 semillas de cada ecotipo por triplicado. La longitud, ancho y espesor se determinó con un micrómetro en cada una de las submuestras de 10 semillas de cada genotipo. El color de las harinas de las semillas sin desamargar de cada ecotipo se determinó por el método CIELAB con un colorímetro triestímulo Chroma Meter II (Minolta Italia SpA, Milan, Italia), con un plato reflector blanco e iluminante C; se evaluó los parámetros L* (Luminosidad), a* (rojo-verde), b (amarillo-azul).

3.7 DESAMARGADO DEL TARWI

Los 20 ecotipos de tarwi fueron sometidos a un proceso de desamargado, de acuerdo a la metodología seguida por Córdova-Ramos *et al.* (2020a). Las muestras de lupino desamargadas fueron molidas en un molino Grindomix GM 200 (Restch GmbH, Germany) a 6,000 RPM por 60 seg., empacadas al vacío en bolsas de polietileno de alta densidad, y almacenadas a -20°C hasta el análisis. En la Figura 4 se presenta el proceso seguido para el desamargado acuoso de los granos de tarwi.

3.8 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Se determinó de acuerdo a los métodos de la AOAC (2000): 920.87 (proteínas, factor de conversión 6.25), 923.05 (lípidos), 923.03 (ceniza) y 925.10 (humedad). Los carbohidratos totales se determinaron por diferencia de 100 menos la suma de proteína, lípidos, ceniza y agua. Los análisis se realizaron por duplicado en cada muestra.

3.9 PROTEÍNA SOLUBLE

Se determinó mediante el método espectrofotométrico de Bradford (1976) (Anexo 1).

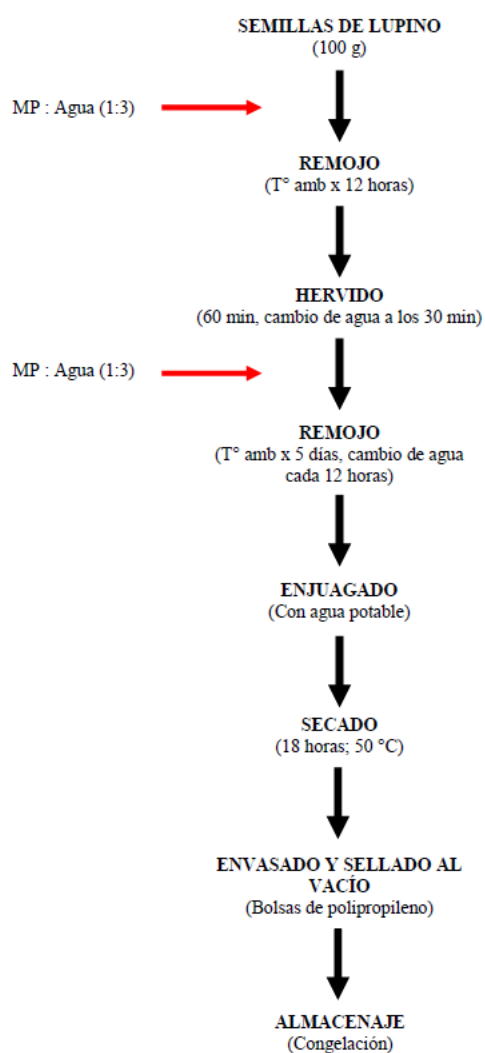


Figura 4: Proceso seguido para el desamargado acuoso de los granos de tarwi

3.10 SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTÉICAS POR ELECTROFORESIS Y ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR

Se separaron las fracciones proteicas de las muestras amargas y desamargadas y se estimó el peso molecular de las diferentes fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS – PAGE (Laemmli 1970) (Anexo 2).

3.11 TOCOFEROLES Y CAROTENOIDES

Se sometieron las muestras molidas a un proceso de saponificación y extracción de los tocoferoles y carotenoides (Anexo 3) de acuerdo a lo recomendado por Hidalgo y Brandolini (2010), y luego se cuantificó mediante cromatografía HPLC con la metodología reportada por Brandolini *et al.* (2015). Los análisis se hicieron a partir de dos extractos diferentes de cada ecotipo. Los resultados se expresaron en mg/kg en base seca.

3.12 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la capacidad antioxidante con los siguientes métodos: PR (Poder Reductor), de acuerdo al procedimiento seguido por Bhalodia *et al.* (2013); ABTS, siguiendo el procedimiento reportado por Re *et al.* (1999); método FRAP y método DPPH, según procedimientos descritos por Yilmaz *et al.* (2015). La capacidad antioxidante se expresó como milimoles de Equivalente Trolox (ET) por kilogramo de materia seca (MS). Todos los ensayos se realizaron por triplicado en muestras independientes (Anexo 4).

3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar las diferencias de los tratamientos que se aplicaron entre los ecotipos de tarwi o área geográfica de origen, se realizó un análisis de variancia (ANOVA) de una vía. Además, se analizó el efecto del desamargado por medio de un análisis de variancia (ANOVA) de dos vías considerando como factores el ecotipo y el tratamiento (amargo y desamargado). Para determinar si existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos se usó la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) ($p \leq 0.05$). Los análisis se hicieron usando el programa estadístico STATGRAPHICS® Centurion XVI v16.2.04 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton VA, USA). Los promedios, la desviación estándar y los errores estándar se obtuvieron empleando el programa Excel (Microsoft® Office Excel 2007).

3.14 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En la Figura 5 se presenta el Diseño Experimental de la investigación. El presente trabajo se desarrolló en tres etapas:

- En la primera etapa se determinaron las características morfológicas y la composición química proximal, el contenido de proteína soluble e insoluble, y la estimación de los pesos moleculares de las fracciones proteicas separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS), tanto en muestras amargas como desamargadas.
- En la segunda etapa se determinó el contenido de tocoferoles y carotenoides en muestras amargas y desamargadas.
- Finalmente, en la tercera etapa se determinó la actividad antioxidante en las muestras desamargadas, mediante cuatro métodos: PR, ABTS, FRAP, y DPPH.

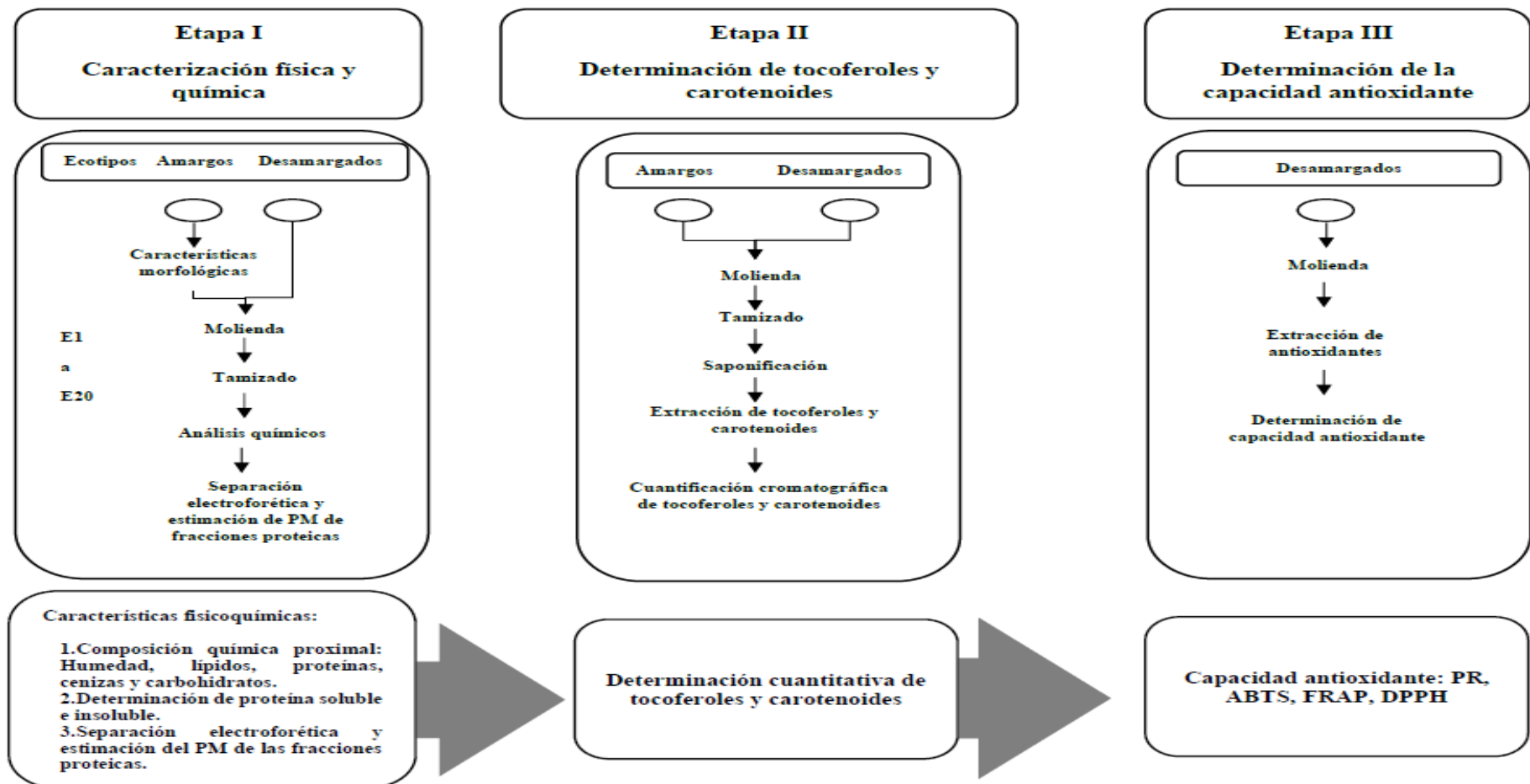


Figura 5: Diseño experimental de la investigación

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS 20 ECOTIPOS DE TARWI (*Lupinus mutabilis*)

Con respecto a las características morfológicas, los 20 ecotipos de tarwi presentaron peso y tamaño variable entre ellos (Tabla 6, Figura. 6); el ANOVA (Anexo 6) mostró diferencias estadísticas significativas en el peso, las dimensiones y los índices del color (principalmente en el índice b*) entre los diferentes ecotipos. El peso de la semilla de todos los ecotipos fluctuó entre 0.198 g y 0.287 g (promedio, 0.249 g), valores similares a los reportados por Mera (2016), 0.180-0.200 mg., quien indica que hay una gran variación en el peso entre estos granos. Las muestras testigo de *L. albus* Ares y *L. angustifolius* Boregine presentan pesos similares a los ecotipos de *L. mutabilis*; mientras que las muestras de *L. albus* Multitalia y *L. luteus* Percoz presentan peso mayor, siendo la de *L. luteus* Percoz la que presenta casi el triple del peso de la semilla del *L. mutabilis*. Con respecto a la forma de la semilla, ésta varía desde oblonga (alargada), en la Puno 2 blanquita (proporción longitud/ancho: 1.34), hasta isodiamétrica en el ecotipo Huallanca (proporción longitud/ancho: 1.00) (Figura 6).

Las dimensiones de largo máximo, ancho máximo y espesor máximo estuvieron entre 8.90 y 10.99 mm (promedio, 9.63 mm), 6.76 y 9.39 mm (promedio, 7.88 mm), 3.26 y 5.87 mm (promedio, 4.83 mm), respectivamente, dimensiones similares a las muestras control o testigo de *L. luteus* Percoz y *L. albus* Ares, pero mayores a las de *L. angustifolius* y menores a las de *L. albus* Multitalia. Entre los ecotipos de *L. mutabilis* (Tabla 6), las muestras con mayores dimensiones de largo (mayor a 10 mm) fueron H6 INIA B/N, H6 INIA B/P, Moteado beige y Yanamuco PLGO y las de menor dimensión (9 mm) fueron Altagracia, Cajamarca, Compuesto blanco semiprecoz y Puno 2 blanquita. En ancho máximo, las de mayor valor (más de 9 mm) fueron Yanamuco PLGO y Huallanca, mientras que de menor valor (menos de 7 mm) fue la muestra Puno 2 blanquita. En cuanto al espesor máximo, la mayoría de ecotipos estuvo por encima de 4.5 mm, mientras que, por debajo de 4 mm se tuvo a los ecotipos Yunguyo, Puno 2 blanquita y Compuesto blanco semiprecoz. Acuña y

Caysa (2010) reportan dimensiones similares para el *L. mutabilis* proveniente de Ecuador: 9.69 mm, 7.83 mm y 5.40 mm, largo, ancho y espesor, respectivamente.

Tabla 6: Características morfológicas de los ecotipos de tarwi

Ecotipo	Peso de semilla (g)	Dmax (mm)	Dmin (mm)	Espesor (mm)
Altagracia	0.239 ± 0.06 ^{efghi}	9.02 ± 0.55 ^{ef}	7.80 ± 0.50 ^{ef}	5.27 ± 0.65 ^{abcdefg}
Andenes 80	0.239 ± 0.11 ^{defghi}	9.88 ± 0.48 ^{bcdef}	8.00 ± 0.53 ^{def}	4.80 ± 0.46 ^{efgh}
Andenes INIA	0.211 ± 0.15 ^{ghi}	9.28 ± 0.82 ^{cdef}	7.81 ± 0.51 ^{ef}	4.66 ± 0.48 ^{fgh}
Cajamarca	0.263 ± 0.08 ^{cdef}	9.01 ± 0.59 ^{ef}	7.39 ± 0.51 ^{fgh}	5.01 ± 0.77 ^{cdefgh}
Cholo fuerte	0.258 ± 0.05 ^{cdefg}	9.71 ± 0.70 ^{cdef}	7.76 ± 0.62 ^{efg}	5.21 ± 0.90 ^{abcdefg}
Compuesto blanco semiprecoz	0.249 ± 0.10 ^{cdefgh}	8.90 ± 0.63 ^f	7.48 ± 0.45 ^{efg}	3.74 ± 0.30 ^{ij}
H6 INIA BN	0.257 ± 0.14 ^{cdefg}	10.18 ± 0.66 ^{bcde}	8.07 ± 0.67 ^{def}	4.49 ± 0.41 ^{ghi}
H6-INIA BP	0.283 ± 0.12 ^{cd}	10.93 ± 0.68 ^b	8.94 ± 0.67 ^{bcd}	4.98 ± 0.35 ^{cdefgh}
Huallanca	0.217 ± 0.12 ^{ghi}	9.39 ± 0.58 ^{cdef}	9.39 ± 0.58 ^{bc}	5.03 ± 0.38 ^{cdefgh}
Huanuco 1	0.232 ± 0.10 ^{efghi}	9.10 ± 0.76 ^{ef}	7.35 ± 0.49 ^{fgh}	5.43 ± 0.46 ^{abcdef}
Huanuco 2	0.224 ± 0.17 ^{efghi}	9.65 ± 0.66 ^{cdef}	7.71 ± 0.6 ^{efg}	5.32 ± 0.57 ^{abcdef}
Lircay	0.269 ± 0.04 ^{cdef}	9.90 ± 0.78 ^{bcdef}	7.89 ± 0.50 ^{ef}	5.08 ± 0.49 ^{bcdefgh}
Moteado Beige	0.287 ± 0.35 ^c	10.46 ± 0.64 ^{bc}	8.20 ± 0.48 ^{def}	4.68 ± 0.50 ^{efgh}
Pallasca	0.273 ± 0.10 ^{cdef}	9.45 ± 0.64 ^{cdef}	8.04 ± 0.56 ^{def}	5.87 ± 0.31 ^{ab}
Paton grande	0.254 ± 0.07 ^{cdefgh}	9.41 ± 0.60 ^{cdef}	7.89 ± 0.29 ^{ef}	5.61 ± 0.56 ^{abcd}
Puno 2 blanquita	0.198 ± 0.16 ⁱ	9.08 ± 0.82 ^{ef}	6.76 ± 0.58 ^{gh}	3.26 ± 0.46 ^j
Yanamuclo 008-1	0.200 ± 0.12 ⁱ	9.22 ± 0.62 ^{def}	8.07 ± 0.46 ^{def}	5.22 ± 0.32 ^{abcdefg}
Yanamuclo 008-3	0.276 ± 0.19 ^{cde}	9.96 ± 1.10 ^{bcdef}	8.46 ± 1.14 ^{cde}	4.85 ± 0.42 ^{defgh}
Yanamuclo PLGO	0.269 ± 0.22 ^{cdef}	10.99 ± 1.26 ^b	9.37 ± 0.70 ^{bc}	4.41 ± 0.42 ^{hi}
Yunguyo	0.263 ± 0.09 ^{abcd}	9.14 ± 0.86 ^{cd}	7.31 ± 0.79 ^{de}	3.43 ± 0.48 ^g
Promedio ± Error estándar	0.249 ± 0.002	9.63 ± .041	7.88 ± 0.038	4.83 ± 0.035
<u>Testigos</u>				
<i>L. albus</i> – Ares	0.205–0.213 ^{hi}	9.70–11.36 ^{bcd}	8.07–10.53 ^b	4.50–5.34 ^{defgh}
<i>L. albus</i> – Multitalia	0.335–0.364 ^b	13.25–15.10 ^a	12.00–14.36 ^a	4.90–6.03 ^{abcde}
<i>L. angustifolius</i> - Boregine	0.280–0.295 ^{cd}	6.63–7.86 ^g	5.94–6.86 ^h	5.11–6.21 ^{abc}
<i>L. luteus</i> – Percoz	0.682–0.731 ^a	9.05–11.22 ^{bcdef}	6.89–8.92 ^{def}	5.53–6.26 ^a

Con respecto al color visual (Figura 6), la mayoría de los 20 ecotipos presentan tonos claros con ligeras variaciones de matiz, variando de blanco a crema, con excepción de los ecotipos H6 INIA BN y Moteado beige, los cuales presentan una mancha oscura y marrón claro, respectivamente. Estas variaciones en las dimensiones y el color de las semillas de los 20 ecotipos de tarwi concuerda con lo manifestado por Blanco-Galdos (1982), citado por Giulisano *et al.* (2019), quien menciona que la diversidad fenotípica en la forma y el color de las semillas observada en el *L. mutabilis* parece ser mayor que en los demás altramuces;

indican además que el color de la semilla es un factor importante para su aceptación cuando son comercializados como alimento, y que en el caso del *L. mutabilis*, el color blanco es el más atractivo para los consumidores.



Figura 6: Fotografía de los ecotipos de tarwi analizados

En la Figura 7 y en el Anexo 5 y se presentan los resultados de las mediciones de los parámetros de color L^* , a^* , b^* en los 20 ecotipos en estudio.

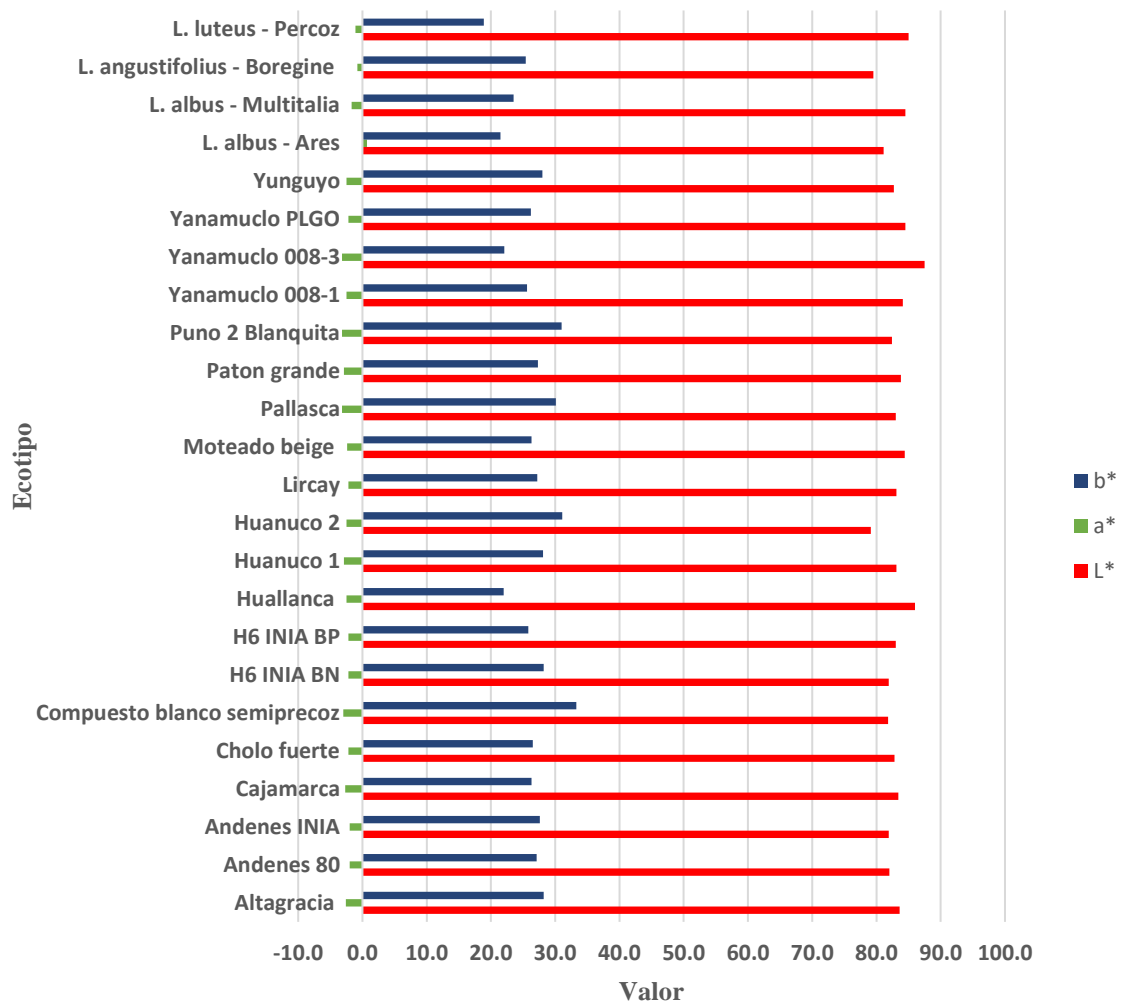


Figura 7: Parámetros del color L*, a*, b* de las harinas de los 20 ecotipos de tarwi sin desamargar y de las muestras testigo

Se puede observar (Figura 7) que todos los ecotipos presentan un alto valor de L*, 81.2 en promedio (rango: 79.1 a 87.5), lo cual indica tonos bastante claros, ya que, en este sistema de medición del color, los valores de L* fluctúan entre 0 (negro) y 100 (blanco). Con respecto al parámetro a* (rojo para valores positivos; verde para valores negativos), el promedio entre los 20 ecotipos es de -2.1 (rango: -2.0 a -3.2), indicando un componente del color o tono ligeramente verde, considerando que la escala de los valores de -a* va de 0 a -60. En tanto que el parámetro b* (amarillo para valores positivos; azul para valores negativos) obtuvo un valor promedio de 23 (rango: 22.0 a 33.3), lo que significa un componente del color de tonalidad amarilla, teniendo en cuenta que la escala de valores positivos de b* va de 0 a 60. Comparados con las muestras testigo, los valores de L* son similares, es decir, las muestras testigo tienen una claridad similar a la de los 20 ecotipos del tarwi (*L. mutabilis*), salvo la

muestra de *L. angustifolius*, la que presenta un valor menor al promedio de los 20 ecotipos y a las otras muestras testigo. En cambio, en el parámetro a^* sí se nota una mayor diferencia entre los ecotipos de *L. mutabilis* (promedio de $a^* = -2.1$) y las muestras testigo (0.7 a -1.7). El parámetro b^* de los ecotipos de *L. mutabilis* (promedio de $b^* = 23$) también muestra valores cercanos a las muestras testigo (18.9 a 25.4), siendo la muestra de *L. luteus* la que más se diferencia de las otras muestras control, con un valor de b^* de 18.9.

Es muy escasa la información con respecto a las mediciones del color de la semilla de lupino, por lo que es difícil comparar los ecotipos procedentes de diferentes condiciones agronómicas. Córdova-Ramos *et al.* (2020a) han observado similares valores de L^* , a^* y b^* entre tres muestras de *L. mutabilis*: 61.21 ± 0.10 , 2.22 ± 0.10 y 11.47 ± 0.04 ; estos valores difieren de los encontrados en esta investigación en los 20 ecotipos (81.2; -2.1; 23, valores promedio de L^* , a^* y b^* , respectivamente). Por su parte, Yorgancilar y Bilgicli (2014) reportan valores de 65.2 ± 0.03 , 7.0 ± 0.11 y 20.3 ± 0.11 en *L. albus*; en este caso, sólo el valor de L^* difiere significativamente con el observado en esta investigación para las muestras testigo de *L. albus* Ares y el *L. albus* Multitalia, 81.1 y 84.5, respectivamente.

4.2 DESAMARGADO DEL TARWI

Luego de las primeras 12 horas de remojo de los granos de tarwi (Figura 8), se produjo un incremento en el peso debido a la absorción de agua en todos los ecotipos. El porcentaje promedio de absorción de agua entre todos los ecotipos fue de 97.3%, con valores fluctuantes entre 47.8 por ciento (Huallanca) y 141.5 por ciento (Moteado beige). Ortega-David *et al.* (2010) reportan resultados en algunos cultivares de *L. mutabilis*, en los que muestra diferentes períodos de latencia, algunos con períodos de 8 a 10 horas, mientras que en otros la máxima absorción de agua se produce dentro de las cuatro primeras horas de remojo del grano. Existe escasa información sobre el grado de absorción de agua del grano de tarwi durante el remojo; como referencia, Quispe (2015) encontró que el incremento de peso más importante en muestras de nueve genotipos de *L. mutabilis* y una de *L. albus* se dio en la etapa de remojo (12 horas), con incrementos de más de 100 por ciento. Suca y Suca (2015) reportan un valor de agua absorbida por la harina de tarwi de 120 por ciento, aunque no

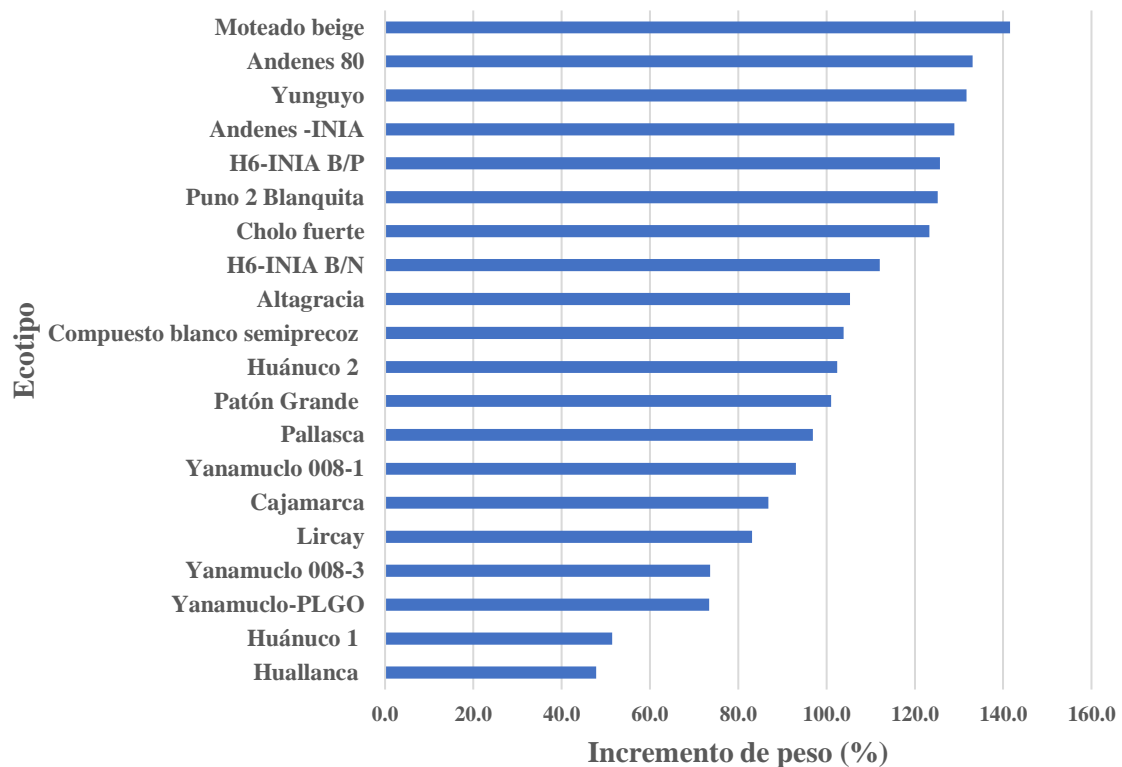


Figura 8: Absorción de agua de los 20 ecotipos de tarwi durante las primeras 12 horas de remojo

indican las condiciones bajo las cuales se obtuvo este valor; mientras que Carvajal-Larenas (2016) menciona una capacidad de absorción de agua de la harina de *L. mutabilis* de 1.2 g de agua/g de harina, o sea, alrededor de 120 por ciento, valor más bajo que otras especies de lupino, debido probablemente a la mayor cantidad de grasa del *L. mutabilis*. Por su parte, Ortega-David *et al.* (2010) determinaron en *Lupinus mutabilis*, sembrado en los Andes de Colombia, durante la hidratación de la semilla un incremento de 1.72 veces su tamaño original; mientras que, Erbas (2010) probó varios métodos de desamargado de semillas de *L. albus* e indica que la ganancia de peso por la hidratación fue similar con todos los métodos ensayados, produciéndose, en promedio, una ganancia de peso del grano de aproximadamente el doble de su peso inicial, o sea el 100 por ciento. Las muestras que tuvieron un mayor incremento de peso debido a la absorción de agua, por encima del 100 por ciento, durante las primeras 12 horas de remojo fueron Moteado beige, Andenes 80, Yunguyo, Andenes INIA, H6 INIA B/P, Puno 2 blanquita, Cholo fuerte, H6 INIA B/N, Compuesto blanco semiprecoz, Altagracia, Paton grande y Huánuco 2; las que presentaron la menor absorción de agua, alrededor del 50 por ciento, fueron Huallanca y Huánuco 1.

Ortega-David *et al.* (2010) sostienen que existe una fuerte interacción entre la composición de la semilla, principalmente el contenido de proteína, y la capacidad de retención de agua. El proceso de hidratación de los granos, en este caso, puede ocurrir mediante difusión o a través de los conductos de diferente tamaño (capilaridad) en el grano de acuerdo a su estructura compleja, composición y zonas con variada permeabilidad a través de las cuales puede fluir el agua; la cubierta de estos granos puede ser completa o parcialmente impermeable al agua, dependiendo de su composición y estructura (Miano y Duarte 2017); el espesor del tegumento también podría influir en las diferencias en la cantidad de absorción de agua entre los diferentes ecotipos, ya que el espesor varía de acuerdo a la especie y la variedad (Manrique 2015); así, las diferencias en la cantidad de agua absorbida entre los diferentes ecotipos estaría indicando diferente estructura física y química en la cubierta o tegumento y en el grano de los diferentes ecotipos de esta especie de lupino; Ortega-David *et al.* (2010) sugieren que la proteína de la semilla posee afinidad hidrofílica evidenciada por la alta capacidad de retención de agua del grano. La hidratación de los granos antes el proceso de cocción es una operación importante ya que ayuda a ablandar la estructura del grano y de este modo reduce el tiempo de cocción. Según Miano y Duarte (2017), el proceso de hidratación promueve la activación de las enzimas de la pared celular generando una disminución en el grado de polimerización de las ramnagalacturonanas e incrementa la solubilidad de las poligalacturonanas, lo cual resulta en un menor tiempo de cocción; las ramnagalacturonanas son polímeros de alto peso molecular, con un grado de polimerización alrededor de 2,000, compuestos por ácido galacturónico y ramnosa (aprox. 2:1) (Sánchez 1996).

Después del hervido por una hora de las muestras que habían sido remojadas durante 12 horas se produjo un incremento adicional en el peso (Tabla 7, Figura 9), 12.4 por ciento en promedio, incremento menor que durante las primeras 12 horas de remojo, lo cual guarda relación con lo reportado por Villacres *et al.* (2015), quienes determinaron que la mayor velocidad de absorción de agua se produce durante las primeras tres horas de remojo. Este incremento fue variable, desde 1.2 por ciento (ecotipos Andenes INIA y Yunguyo) y 1.3 por ciento (ecotipo Andenes 80), hasta 38.8 y 39.3 por ciento en los ecotipos Huallanca y Huánuco 1, respectivamente; Miano y Duarte (2017) indican que, todos los trabajos muestran que cuando mayor es la temperatura de remojo, mayor es la velocidad de hidratación, y que esta mayor velocidad se ve influida por: (i) incremento en las velocidades de reacción, (ii) reducción de la viscosidad del agua, lo cual mejora el flujo por capilaridad,

(iii) dilatación de los tejidos y poros, (iv) solubilización parcial de algunos componentes, lo cual incrementa el tamaño del poro.

Tabla 7: Incremento en el peso (porcentaje) después del hervido por una hora en las muestras que habían sido remojadas por 12 horas

Ecotipo	Incremento de Peso (porcentaje)
Altagracia	8.8
Andenes 80	1.3
Andenes INIA	1.2
Cajamarca	11.4
Cholo fuerte	3.8
Compuesto blanco semiprecoz	9.7
H6-INIA B/N	7.6
H6-INIA B/P	5.8
Huallanca	38.8
Huánuco 1	39.3
Huánuco 2	3.0
Lircay	9.5
Moteado beige	7.5
Pallasca	12.3
Patón Grande	8.7
Puno 2 Blanquita	12.7
Yanamuclo 008-1	13.1
Yanamuclo 008-3	18.3
Yanamuclo-PLGO	33.0
Yunguyo	1.2
Promedio	12.4

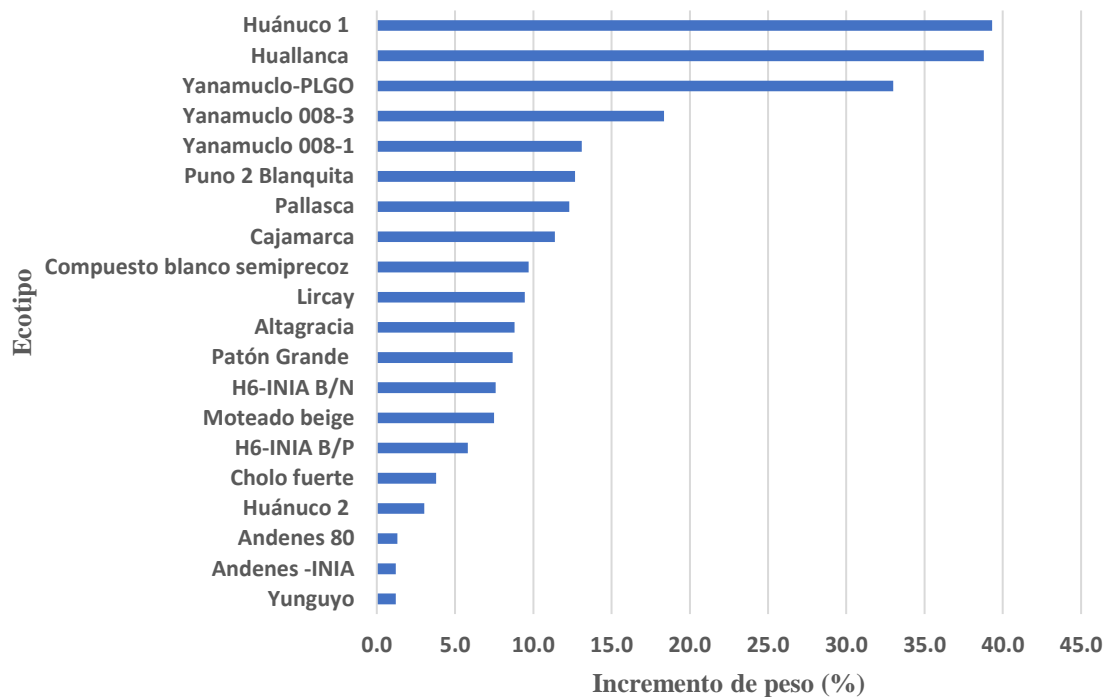


Figura 9: Incremento de peso (porcentaje) luego del hervido por una hora con respecto a las muestras remojadas por 12 horas

Luego, durante el remojo sucesivo por cinco noches, posterior al remojo por 12 horas y el hervido por 1 hora, se produjo un incremento de peso de los granos debido a la absorción de agua de 150 por ciento en promedio (Figura 10), llegando a alcanzar un incremento de alrededor de 2.5 veces su peso inicial; Caicedo (2001), citado por Carvajal-Larenas *et al.* (2013), menciona un índice de hinchamiento del altramuz de 2,3 veces la materia prima, lo que equivaldría aproximadamente a un incremento de peso de similar magnitud.

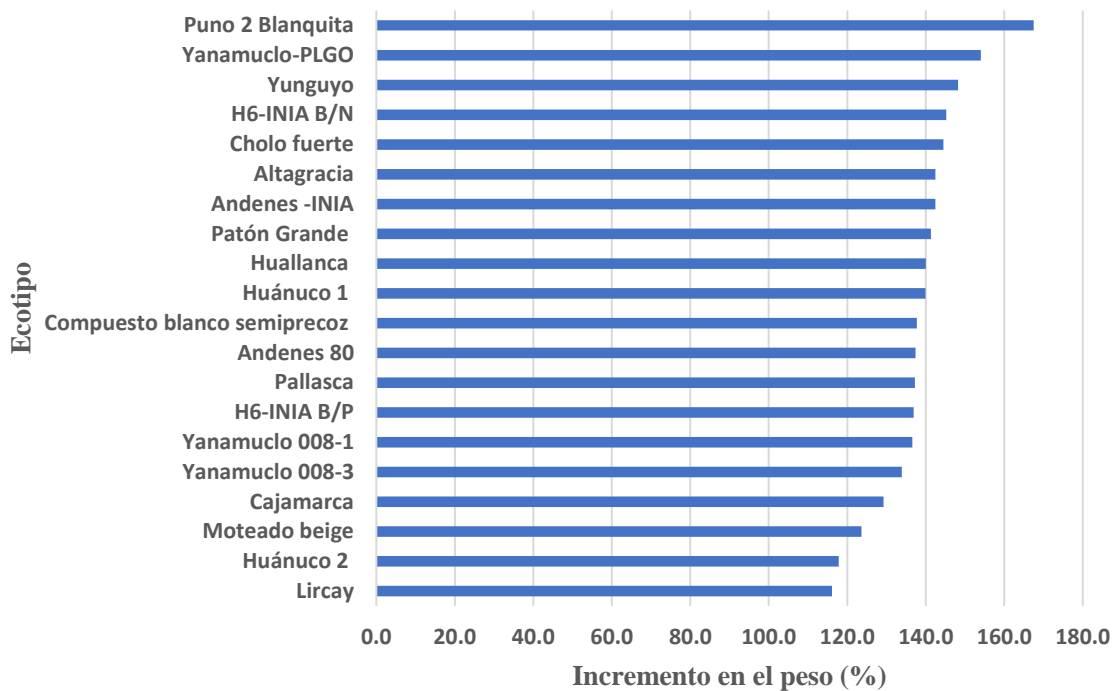


Figura 10: Incremento en el peso luego del remojo y lavado durante cinco días con respecto a las muestras remojadas por 12 horas y hervidas por una hora

Después del secado de las muestras desamargadas se produjo una pérdida de peso, con respecto al grano inicial, de 22.9 por ciento en promedio (Tabla 8, Figura 11), la mayor pérdida de peso se produjo en el ecotipo Andenes 80 (31.6 por ciento) y la menor en el ecotipo Huánuco 1 (16.6 por ciento), lo cual representa una pérdida notable de sólidos durante el proceso de desamargado; estos sólidos perdidos, estarían principalmente conformados por proteínas solubles y otros sólidos como compuestos fenólicos, alcaloides, etc. Estos niveles de pérdida de sólidos después del proceso de desamargado son muy parecidos a los reportados por otros autores. Así, Quispe (2015) encontró que después del proceso de desamargado de 10 genotipos de lupino disminuyeron su contenido de materia seca, entre 20 por ciento y 30 por ciento. Villaverde (2011), mencionado por Quispe (2015), reporta haber determinado una disminución significativa de proteína de 47.21 por ciento a 20.63 por ciento después del proceso de desamargado (Remojo por 24 horas; cocción por una hora y lavado durante 5 días). Swisscontact (sf) indica que el proceso acuoso de desamargado del tarwi genera altas pérdidas de sólidos (27 g/100g de materia seca). Por su parte, Espejo (2017), después del desamargado del tarwi, en cuyo proceso se hizo el lavado durante siete días, reporta una merma de los sólidos de 28.5 por ciento. Mientras que, Carvajal-Larenas *et al.* (2013) mencionan una pérdida de sólidos después de sólo el remojo y la cocción de

alrededor de 23 por ciento; asimismo, Erbas (2010) señala una pérdida de materia seca durante el proceso de desamargado de alrededor del 20 por ciento. Como se puede ver, se reportan diferentes valores de pérdida de sólidos después de las diversas operaciones de desamargado, estas diferencias están influidas por las diferentes condiciones o parámetros de operación aplicados por los diferentes investigadores. En todo caso, lo que sí se puede afirmar es que se produce una pérdida significativa de sólidos solubles, entre los cuales se tiene proteínas solubles (Prusinski 2017), carbohidratos, minerales, alcaloides, etc. Suca y Suca (2015) indican que durante el proceso de desamargado acuoso de producen altas pérdidas de sólidos, aunque no reporta valores.

Tabla 8: Pérdida de peso (porcentaje), con respecto al peso inicial (bs) de los granos, después del secado de las muestras desamargadas

Ecotipo	Pérdida de Peso después secado luego de 5 días de remojo (porcentaje)
Altagracia	19.2
Andenes 80	31.6
Andenes -INIA	20.7
Cajamarca	21.6
Cholo fuerte	19.0
Compuesto blanco semiprecoz	22.4
H6-INIA B/N	21.6
H6-INIA B/P	25.7
Huallanca	19.0
Huánuco 1	16.6
Huánuco 2	28.5
Lircay	24.1
Moteado beige	31.1
Pallasca	21.8
Patón Grande	19.3
Puno 2 Blanquita	20.4
Yanamucllo 008-1	19.5
Yanamucllo 008-3	26.6
Yanamucllo-PLGO	19.8
Yunguyo	28.6
Promedio	22.9 (19.07 por ciento CV)

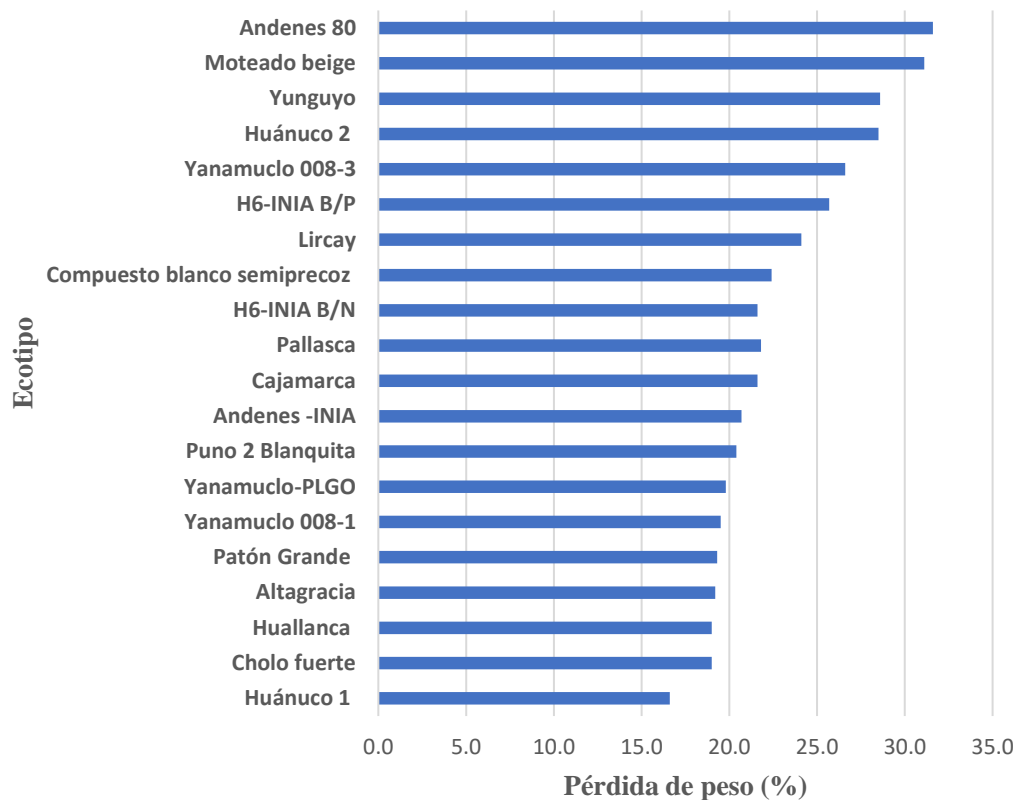


Figura 11: Pérdida de peso (porcentaje), con respecto al peso inicial (bs) de los granos, después del secado de las muestras desamargadas

4.3 COMPOSICIÓN QUÍMICO PROXIMAL DE LOS 20 GENOTIPOS DE LUPINO (*Lupinus mutabilis*)

El conocimiento de la composición química de las semillas de lupino es uno de los factores importantes para la decisión de su uso en la industria alimentaria. En el Tabla 9 se presentan los resultados de la composición químico proximal de los ecotipos de tarwi (*L. mutabilis*) en estudio. El aspecto más importante en cuanto a su composición químico proximal es el contenido de proteína. Casi todos los ecotipos en estudio presentaron valores de proteína por encima del 40 por ciento, siendo el promedio de los 20 ecotipos de 41.8 por ciento (5.48 por ciento CV), con excepción de los ecotipos Andenes 80 y Puno 2 Blanquita, con valores de 35.6 por ciento y 38 por ciento respectivamente. Estos resultados se asemejan a los reportados para el contenido de proteínas en *L. mutabilis* ecuatoriano (41,4-47,7 g/100 g MS) (Schoeneberger *et al.* 1982) y en ecotipos peruanos (34,6-50,2 g/100 g MS) (Caligari *et al.* 2000), así como a los valores resumidos por Carvajal-Larenas *et al.* (2016) (32,0-52,6 g/100 g MS).

Tabla 9: Análisis químico proximal de los 20 ecotipos de tarwi amargo (*Lupinus mutabilis*) (g/100 g)

Ecotipo	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza	CHOs
Altagracia	9.80 ± 0.06 ^{gh}	44.50 ± 0.08 ^a	15.60 ± 0.04 ^{gh}	2.90 ± 0.06 ^{kl}	27.20 ± 0.04 ^{fgh}
Andenes 80	10.90 ± 0.06 ^c	35.60 ± 0.19 ^{fg}	18.10 ± 0.14 ^{ab}	4.30 ± 0.06 ^{ab}	31.10 ± 0.17 ^{def}
Andenes INIA	10.50 ± 0.03 ^d	42.40 ± 0.31 ^{abc}	18.55 ± 0.18 ^a	3.70 ± 0.08 ^{fg}	29.15 ± 0.07 ^h
Cajamarca	9.91 ± 0.02 ^{fg}	42.10 ± 0.19 ^{abcd}	14.30 ± 0.04 ^{ij}	3.40 ± 0.06 ^{hi}	30.30 ± 0.12 ^{defg}
Cholo fuerte	9.40 ± 0.03 ^{jk}	41.10 ± 0.13 ^{abcd}	16.40 ± 0.08 ^{defg}	3.40 ± 0.01 ^{hi}	29.70 ± 0.06 ^{efg}
Compuesto blanco semiprecoz	9.70 ± 0.01 ^{ghi}	42.80 ± 0.17 ^{ab}	17.10 ± 0.07 ^{cde}	2.80 ± 0.04 ^l	27.60 ± 0.07 ^{fgh}
H6 INIA BN	9.40 ± 0.01 ^{jk}	43.20 ± 0.11 ^{ab}	17.20 ± 0.03 ^{bcd}	2.90 ± 0.04 ^{kl}	27.30 ± 0.19 ^{fgh}
H6-INIA BP	9.20 ± 0.04 ^k	41.10 ± 0.07 ^{abcd}	16.22 ± 0.28 ^{efg}	4.20 ± 0.06 ^{abc}	29.28 ± 0.34 ^{efg}
Huallanca	10.10 ± 0.03 ^{ef}	38.20 ± 1.70 ^{cdef}	15.90 ± 0.35 ^{fgh}	3.50 ± 0.04 ^{gh}	32.30 ± 2.04 ^{cde}
Huanuco 1	9.90 ± 0.07 ^{fg}	40.70 ± 0.04 ^{abcde}	14.30 ± 0.16 ^{ij}	4.40 ± 0.04 ^a	30.70 ± 0.17 ^{defg}
Huanuco 2	13.80 ± 0.03 ^a	42.00 ± 0.14 ^{abcd}	13.60 ± 0.08 ^j	3.80 ± 0.03 ^{ef}	26.80 ± 0.17 ^{gh}
Lircay	8.30 ± 0.06 ^{mn}	36.60 ± 0.23 ^{ef}	17.10 ± 0.11 ^{cde}	4.10 ± 0.06 ^{bcd}	33.90 ± 0.11 ^{cd}
Moteado Beige	9.60 ± 0.06 ^{hij}	42.70 ± 0.81 ^{ab}	16.30 ± 0.38 ^{defg}	3.10 ± 0.04 ^k	28.30 ± 1.17 ^{efgh}
Pallasca	8.60 ± 0.05 ^l	42.18 ± 1.24 ^{abcd}	15.90 ± 0.42 ^{fgh}	3.40 ± 0.07 ^{hi}	29.93 ± 0.83 ^{defg}
Paton grande	9.80 ± 0.07 ^{gh}	43.70 ± 0.18 ^a	16.70 ± 0.08 ^{def}	3.10 ± 0.07 ^{jk}	26.70 ± 0.24 ^{gh}
Puno 2 blanquita	11.40 ± 0.04 ^b	38.00 ± 0.18 ^{def}	16.30 ± 0.03 ^{defg}	4.40 ± 0.07 ^a	29.90 ± 0.18 ^{defg}
Yanamucllo 008-1	9.50 ± 0.03 ^{ij}	43.30 ± 1.34 ^{ab}	16.95 ± 0.41 ^{cde}	2.70 ± 0.10 ^l	27.55 ± 0.86 ^{fgh}
Yanamucllo 008-3	8.50 ± 0.141 ^{lm}	40.30 ± 0.11 ^{abcde}	15.00 ± 0.11 ^{hi}	4.00 ± 0.06 ^{cde}	32.20 ± 0.08 ^{cde}
Yanamucllo PLGO	9.40 ± 0.08 ^{jk}	42.20 ± 0.26 ^{abcd}	17.80 ± 0.31 ^{abc}	2.90 ± 0.01 ^{kl}	27.70 ± 0.49 ^{fgh}
Yunguyo	10.51 ± 0.15 ^d	41.64 ± 2.49 ^{abcd}	14.16 ± 0.65 ^{ij}	3.85 ± 0.08 ^{def}	29.85 ± 1.64 ^{defg}
Promedio ± error estándar	9.91 ± 0.27	41.42 ± 0.55	16.17 ± 0.29	3.54 ± 0.13	29.37 ± 0.52
Rango	8.50 – 13.80	35.60 – 44.50	13.60 – 18.55	2.70 – 4.40	26.70 – 33.90
Testigos					
Ares - <i>L. albus</i>	11.04 ± 0.06 ^c	32.20 ± 0.00 ^{gh}	7.56 ± 0.04 ^l	3.50 ± 0.09 ^{gh}	45.70 ± 0.18 ^b
Dulce 7 - <i>L. albus</i>	10.35 ± 0.04 ^{de}	29.93 ± 2.22 ^h	9.52 ± 0.17 ^k	3.35 ± 0.06 ^{hij}	46.85 ± 2.39 ^b
Multitalia - <i>L. albus</i>	7.98 ± 0.06 ^o	30.93 ± 1.47 ^h	14.30 ± 0.16 ^{ij}	3.42 ± 0.10 ^{hi}	35.19 ± 2.62 ^c
Boregine - <i>L. angustifolius</i>	11.15 ± 0.08 ^{bc}	29.16 ± 0.55 ^h	5.15 ± 0.06 ^m	3.22 ± 0.09 ^{ij}	51.31 ± 0.49 ^a
<i>L. luteus</i>	8.06 ± 0.04 ^{no}	39.03 ± 2.72 ^{bcdef}	14.30 ± 0.16 ^{ij}	3.42 ± 0.10 ^{hi}	35.19 ± 2.62 ^c

Este rango de valores encontrado entre los diferentes ecotipos de tarwi, según Carvajal-Larenas *et al.* (2016), está asociado con factores genéticos y agronómicos; además, la composición química de las semillas de lupino depende mucho de la especie en particular y de las condiciones ambientales del cultivo (Czubinski *et al.* 2021; Prusinski *et al.* 2017). El promedio de los 20 ecotipos en estudio es superior al presentado por las muestras testigo analizadas (alrededor del 30 por ciento), salvo la muestra de *L. luteos* Percoz, con un contenido de 39.03 por ciento bastante similar al *L. mutabilis*. Valores similares han sido mostrados por otros investigadores, como Borja (2014), quien reporta un contenido de proteína para el tarwi amargo, en general, sin especificar ecotipo, de 41.20 por ciento, valor mucho mayor comparado con el de la soya (33.4 por ciento) y el frijol (22 por ciento). Indica también que se han realizado estudios en más de 300 diferentes genotipos en los que la proteína varía de 41 por ciento a 51 por ciento. Por su lado, Amor (2022) indica que, en el caso particular de las semillas de altramuza (*Lupinus* spp.), según la literatura, éstas presentan entre un 30 y 42 por ciento de proteína, las cuales están constituidas en su mayoría por globulinas (87 por ciento). Bartkiene *et al.* (2016) explican que, de acuerdo a la literatura, existe una considerable variación en el contenido de proteína entre las diversas especies y cultivares de lupino, variación que estaría también influida por las condiciones de crecimiento y tipos de suelo.

Estadísticamente no se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) en el contenido de proteína bruta entre los ecotipos Altagracia, Andenes INIA, Cajamarca, Cholo fuerte, Compuesto blanco semiprecoz, H6 INIA BN, H6 INIA BP, Huanuco 1, Huanuco 2, Moteado Beige, Pallasca, Paton grande, Yanamucllo 008-1, Yanamucllo 008-3, Yanamucllo PLGO, Yunguyo. Estas muestras presentaron el mayor contenido de proteína bruta, por encima del 40 por ciento. Sí hubo diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre estos ecotipos y el resto, incluidas las muestras control, las que estuvieron por debajo del 40 por ciento. Los ecotipos Andenes 80 y Puno 2 blanquita presentan los menores valores, los cuales sí muestran diferencias significativas estadísticamente ($p < 0,05$) con respecto al resto de ecotipos (Anexo 6).

El otro componente importante en el lupino es la grasa; esta fluctuó entre 13.7 por ciento y 18.6 por ciento, con un promedio de 16.17 por ciento (7.97 por ciento CV), valor muy superior, aproximadamente el doble, al presentado por las muestras testigo o control, con excepción de la muestra de *L. luteus* (14.3 por ciento). Valores similares son indicados por

Schoeneberger *et al.* (1982) para el *L. mutabilis* ecuatoriano (15,0-20,1 g/100 g MS) y por Caligari *et al.* (2000) en ecotipos peruanos (14,3-23,6 g/100 g MS, así como por Carvajal-Larenas *et al.* (2016) (13,0-24,6 g/100 g MS). Neves *et al.* (2016) reportan un contenido de grasa de hasta 19 por ciento en muestras de 149 accesiones de *L. mutabilis* provenientes de Perú y cultivadas en Lisboa, e indican que el tarwi es la única especie de lupino capaz de alcanzar el valor de 18 por ciento de aceite (el mínimo para la extracción industrial); por su parte, Gresta *et al.* (2017) reportan un rango de 15-17 por ciento, Bartkiene *et al.* (2016) mencionan valores entre 13 por ciento y 23 por ciento, Carvajal-Larenas *et al.* (2016) señalan un rango de 13.0 por ciento a 24.6 por ciento, y Suca y Suca (2015) informan que estudios realizados en más de 300 genotipos diferentes muestran que el aceite varía de 14 por ciento a 24 por ciento. Además de factores genéticos y agronómicos, el estrés hídrico, entre otros, es un factor que influye en la variabilidad del contenido de lípidos entre los diversos ecotipos (Carvalho *et al.* 2005 citados por Carvajal-Larenas *et al.* 2016). No se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre los ecotipos Andenes 80, Andenes INIA y Yanamucllo PLGO, los que mostraron un contenido de grasa alrededor del 18 por ciento; pero sí se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre éstos y el resto de ecotipos, de los cuales, la mayoría estuvieron por debajo del 17 por ciento, incluidas las muestras control, las que tuvieron un contenido mucho menor, por debajo del 10 por ciento, excepto la muestra de *L. luteus* (14.3 por ciento).

Tanto en proteína como en lípidos, sólo el *L. luteus* de las muestras testigo no presentó diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) con la mayoría de los ecotipos de *L. mutabilis*. Las muestras testigo de *L. angustifolius* y *L. albus* presentaron contenidos menores de proteína y grasa con respecto a los ecotipos de *L. mutabilis*, con diferencia estadística significativa ($p < 0,05$). En cuanto a las cenizas, el menor contenido se observó en Yanamucllo 008-1 (2,70 g/100 g MS) y el mayor en Puno 2 blanquita y Huánuco 1 (4,40 g/100 g MS), variación muy similar a la reportada por Carvajal-Larenas *et al.* (2016) (2,4-5,2 g/100 g MS). Los carbohidratos, obtenidos por diferencia, oscilaron entre 24,85 g/100 g MS (Andenes INIA) y 33,90 g/100 g MS (Lircay), valores que caen dentro del extremo inferior de la distribución (26,1-43,2 g/100 g MS) descrita por Carvajal-Larenas *et al.* (2016).

Los resultados de la composición química de los ecotipos del *L. mutabilis* analizados en esta investigación son más parecidos a los de la muestra testigo del *L. luteus*. Por su parte, Czubinski *et al.* (2021) indican que la composición de los principales nutrientes de las

semillas del lupino Andino presenta ciertos rasgos típicos del *L. albus* mientras que otros son más característicos de *L. angustifolius*.

4.4 CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE EN MUESTRAS AMARGAS Y DESAMARGADAS

En el Tabla 10 se muestra las cantidades de proteína total (Nx6.25) y de proteína soluble en las muestras enteras (sin desamargar) y de proteína soluble en las muestras desamargadas. En las muestras enteras (sin desamargar), el promedio de proteína total es de 41.3 por ciento, fluctuando entre 35.6 por ciento (Andenes 80) y 44.5 por ciento (Altagracia), mientras que el contenido de proteína soluble fluctúa entre 14.1 por ciento (Yunguyo) y 33.2 por ciento (Lircay), con un promedio de 21.3 por ciento. Como se puede observar, el contenido de proteína soluble en las semillas enteras (sin desamargar) del lupino no es similar en todos los ecotipos, encontrándose valores en el rango de 14.1 por ciento a 33.2 por ciento. Por efecto del desamargado se produce una disminución considerable del contenido de proteína soluble en todas las muestras; en el ecotipo Lircay se produjo la mayor pérdida, de 33.2 por ciento a 1.1 por ciento (diferencia de 32.1 por ciento), mientras que la menor pérdida se dio en el ecotipo Yunguyo, de 14.1 por ciento a 1.1 por ciento (diferencia de 13 por ciento); la diferencia promedio de proteína soluble entre la muestra amarga y la muestra desamargada entre todos los ecotipos fue de 20.2 por ciento. Esta pérdida considerable de proteína soluble después del proceso de desamargado se debería a la coagulación de algunas proteínas como las albúminas durante la etapa de cocción por una hora; estas proteínas coaguladas dificultarían su extracción para su cuantificación al disminuir su solubilidad, por lo que los valores resultarían bajos; también se debería a la solubilización de las albúminas durante el remojo en agua por 12 horas y durante los siguientes cinco días con sucesivos lavados del grano durante el proceso de desamargado, pues se sabe que estas proteínas son muy solubles en agua (Duranti *et al.* 2008); Erbas (2010) manifiesta que el proceso de desamargado por hervido de las semillas y el remojo en agua remueve una gran cantidad de proteínas solubles. Por su parte, Villacres *et al.* (2006) reportan un contenido de proteína soluble en el chocho desamargado de 12.81 por ciento (no especifica ecotipo), pero este proceso de desamargado se realizó sólo durante 40 horas, mientras que en esta investigación se realizó durante cinco días (120 horas), además del previo remojo por 12 horas y hervido durante 1 hora. Por otro lado, la pérdida de proteína soluble (20.1 por ciento, en promedio) es concordante con la pérdida de peso (pérdida de sólidos) producida durante el proceso de desamargado, en el que

al finalizar el secado de los granos se encontró una pérdida de peso en promedio de 22.4 por ciento; lo cual también indica que, además de la pérdida de proteína soluble se estarían perdiendo otros sólidos como alcaloides, y polisacáridos solubles. Espejo (2017) encontró que durante el proceso de desamargado se pierden, aparte de alcaloides quinozidinílicos, proteínas solubles en agua, saponinas presentes mayormente en la cascarilla del grano (durante todo el proceso), y compuestos fenólicos polares.

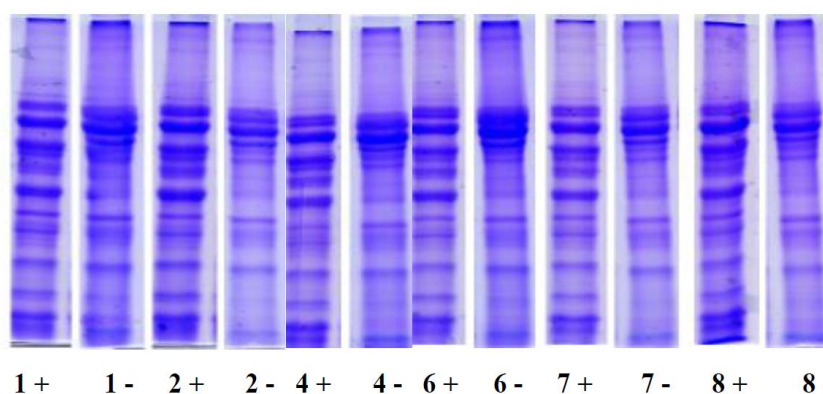
Tabla 10: Resultados (Promedio \pm desviación estándar) de la determinación del contenido de proteína soluble en los 20 ecotipos de tarwi en muestras amargas y desamargadas

Ecotipo	Prot. Total (porcentaje) (N x 6.25)	Proteína soluble (PS)		
		Amarga (porcentaje)	Desamargada (porcentaje)	Diferencia de PS (Amarga- Desamargadas) (%)
Andenes 80	35.6	25.8 \pm 7.5	0.3 \pm 0.24	25.5
Andenes INIA	42.4	14.2 \pm 3.68	0.8 \pm 0.57	13.4
Altagracia	44.5	22.5 \pm 4.53	0.9 \pm 0.28	21.6
Cajamarca	42.1	30.7 \pm 1.98	1.3 \pm 0.28	29.3
Cholo Fuerte	41.1	20.3 \pm 2.97	1.0 \pm 0.42	19.3
Compuesto blanco semiprecoz	42.8	22.9 \pm 3.82	1.1 \pm 0.42	21.8
H6-INIA B/N	43.2	22.2 \pm 2.83	1.1 \pm 0.35	21.1
H6-INIA B/P	41.1	20.0 \pm 4.10	0.9 \pm 0.28	19.1
Huallanca	38.2	21.9 \pm 2.97	0.5 \pm 0.14	21.4
Huánuco 1	40.7	20.0 \pm 2.40	1.6 \pm 1.27	18.4
Huánuco 2	42.0	15.8 \pm 3.68	1.3 \pm 0.71	14.6
Lircay	36.6	33.2 \pm 2.97	1.1 \pm 0.33	32.1
Moteado Beige	42.7	26.1 \pm 5.23	0.9 \pm 0.35	25.2
Pallasca	41.3	18.0 \pm 2.69	1.2 \pm 0.35	16.2
Paton Grande	43.7	19.2 \pm 2.12	1.4 \pm 0.71	17.8
Puno 2 Blanquita	38.0	19.7 \pm 3.11	1.0 \pm 0.14	18.6
Yanamuclo 008-1	43.3	20.4 \pm 2.69	1.1 \pm 0.42	19.3
Yanamuclo 008-3	40.3	20.8 \pm 3.96	1.4 \pm 0.28	19.4
Yanamuclo PLGO	42.2	19.0 \pm 4.10	1.4 \pm 0.57	17.6
Yunguyo	43.4	14.1 \pm 2.69	1.1 \pm 0.57	13.0
Promedio de ecotipos \pm Error estándar		21.3 \pm 4.81	1.07 \pm 0.31	20.2
CV		22.58	28.97	

4.5 SEPARACIONES ELECTROFORÉTICA DE LAS FRACCIONES PROTÉICAS

En la Figura 12 se muestran los resultados de la separación de las fracciones proteicas mediante la electroforesis en gel PAGE-SDS de las muestras de tarwi tratadas con (+) y sin (-) β -mercaptoetanol. Se puede observar que en las muestras tratadas con β -mercaptoetanol

se produce una mejor separación de bandas que en las muestras sin β -mercaptoetanol. Esto demuestra el efecto del β -mercaptoetanol, el cual causa la desnaturalización completa y el desplegamiento de las moléculas de proteína. Por otro lado, esta sustancia rompe los enlaces disulfuro, si es que existieran, que mantienen unidas a las subunidades de la proteína, logrando su separación, lo cual indicaría la presencia de enlaces disulfuro entre las subunidades de proteína. Muranyi *et al.* (2016) indican que, la legumina, llamada también “caseína vegetal”, es una globulina hexamérica (en la que las cadenas peptídicas están conectadas mediante enlaces disulfuro) presente en el *L. angustifolius*; por los resultados obtenidos en las separaciones electroforéticas en las muestras tratadas con β -mercaptoetanol, esta proteína podría estar presente también en *L. mutabilis*.

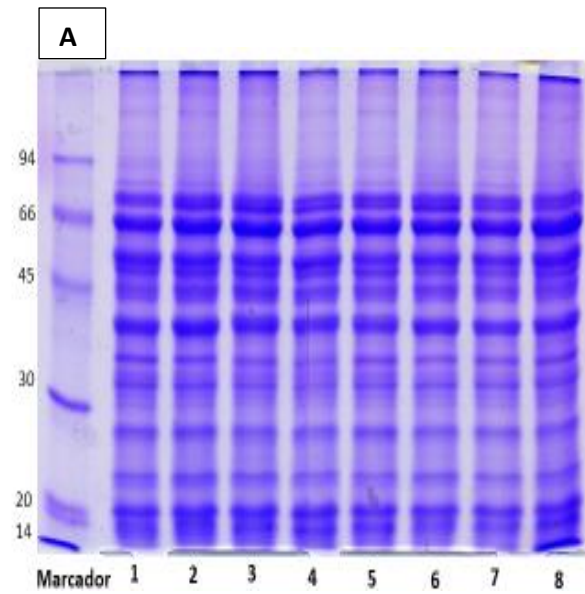


Leyenda: (1) Andenes 80; (2) Andenes INIA; (4) Cajamarca; (6) Compuesto blanco semiprecoz; (7) H6-INIA B/N; (8) H6-INIA B/P

Figura 12: Perfil electroforético en condiciones reductoras (+) y no reductoras (-) de las muestras de tarwi sin desamargar

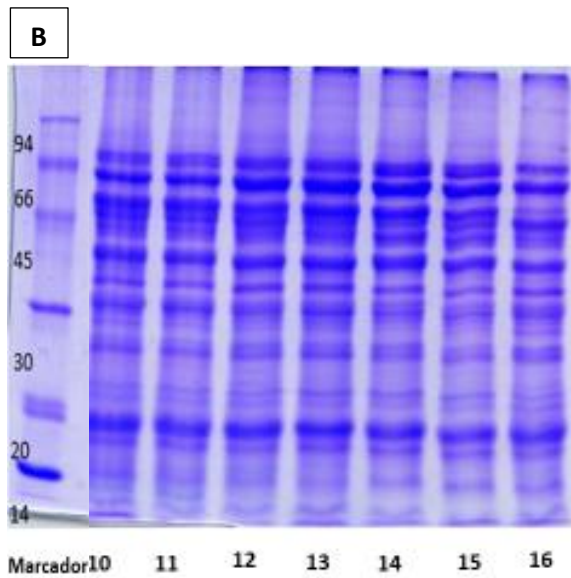
4.5.1 Separaciones electroforética de las fracciones protéicas de las muestras sin desamargar

En base a los resultados obtenidos tratando las muestras con y sin β -mercaptoetanol, se continuó con la separación electroforética de las muestras sin desamargar de los 20 ecotipos en estudio, tratadas con β -mercaptoetanol (Figura 13). Como se puede observar, casi todos los ecotipos presentan el mismo patrón electroforético. También Carvajal-Larenas *et al.* (2016) manifiestan que, el patrón de polipéptidos mostrado por dos cultivares de *L. mutabilis* analizados por SDS-PAGE en condiciones reductoras son virtualmente idénticos pero que difieren considerablemente del mostrado por *L. albus*; por ejemplo, en la fracción de



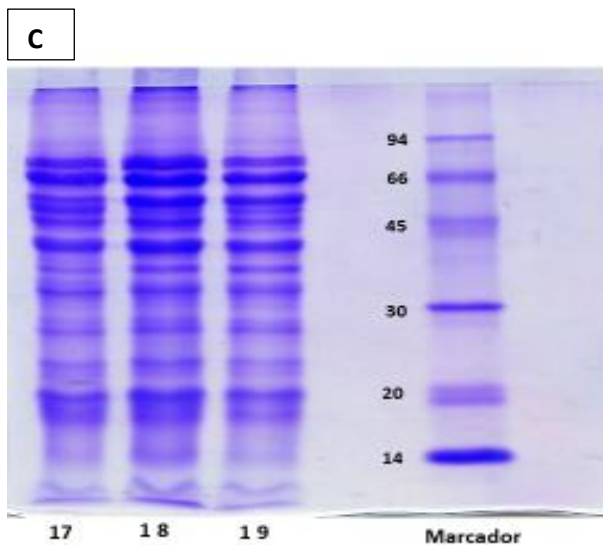
Legenda A:

- 1 Andenes 80**
- 2 Andenes INIA**
- 3 Altagracia**
- 4 Cajamarca**
- 5 Cholo fuerte**
- 6 Compuesto blanco semiprecoz**
- 7 H6-INIA B/N**
- 8 H6-INIA B/P**



Legenda B:

- 10 Huánuco 1**
- 11 Huánuco 2**
- 12 Lircay**
- 13 Moteado Beige**
- 14 Pallasca**
- 15 Paton Grande**
- 16 Puno 2 Blanquita**



Legenda C:

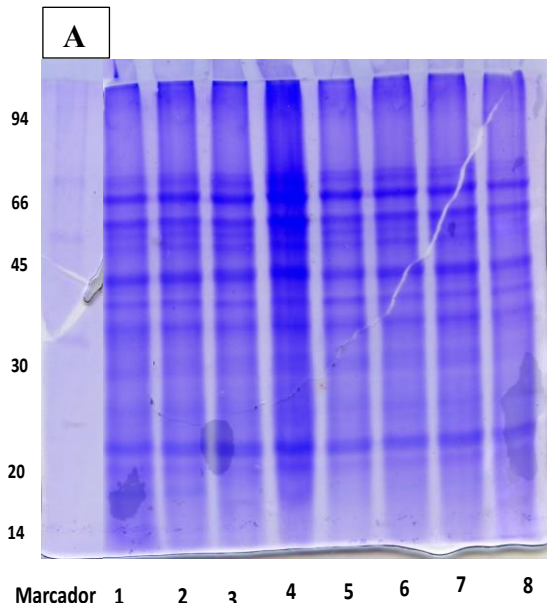
- 17 Yanamucllo 008-1**
- 18 Yanamucllo PLGO**
- 19 Yunguyo**

Figura 13: Perfil electroforético de los 20 ecotipos de tarwi sin desamargar

albúmina predominan los péptidos de 34 kDa en *L. mutabilis*, mientras que en *L. albus* los péptidos de albúmina están en el rango de 6 a 117 kDa.

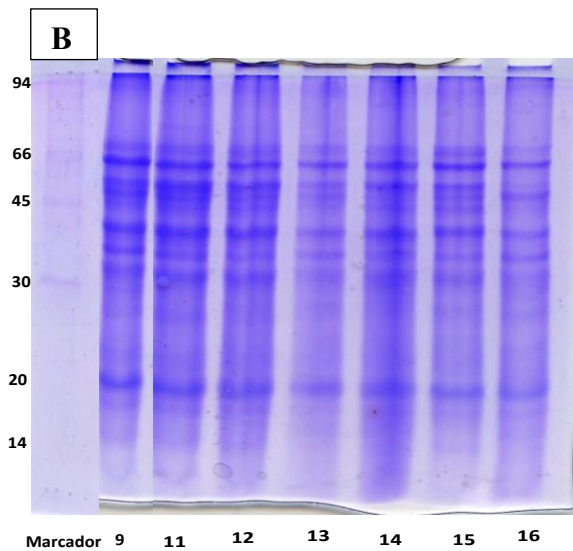
4.5.2 Separaciones electroforética de las fracciones protéicas de las muestras desamargadas

En este caso, las muestras desamargadas presentan similar patrón electroforético (Figura 14) al de las muestras sin desamargar. El hecho de mostrar similitud en los patrones electroforéticos entre las muestras desamargadas y sin desamargar significaría que el proceso de desamargado no implicaría cambios sustanciales en el peso molecular de los péptidos de las proteínas de los ecotipos de tarwi analizados. Mazumder *et al.* (2021) también encontraron similitud de los perfiles electroforéticos en las bandas por debajo de 80 kDa de seis cultivares de *L. angustifolius* y en los cultivares de *L. albus* Luxor y Rosetta, mientras que Albe-Slabi *et al.* (2022) encontraron que, las proteínas extraídas de *L. albus* a pH de 2 a 6 mostraron el mismo patrón electroforético con pesos moleculares aparentes de 3 a 70 kDa, e indican que este perfil electroforético encaja bien con los pesos moleculares de las conglutinas: α -conglutina (19-46 kDa), β -conglutina (19-60 kDa), γ -conglutina (17 y 29 kDa) y δ -conglutina (4 y 9 kDa). Asimismo, Capraro *et al.* (2014) determinaron el perfil electroforético de las proteínas aisladas del *L. albus*, obteniendo un perfil similar al obtenido en esta investigación en el *L. mutabilis*, en el que se aprecian bandas entre 97 y 15 kDa, notándose mayor cantidad de bandas y más concentradas entre los 65 y 30 kDa (Figura 1 carril TPE). Por su parte, Fontanari *et al.* (2012) determinaron el efecto de la sal y del pH durante el aislamiento de las proteínas de semillas de *L. albus* sobre la estructura y la estabilidad de las proteínas presentes en el aislado obtenido; dentro de este estudio determinaron mediante electroforesis SDS-PAGE los perfiles electroforéticos de los respectivos aislados proteicos encontrando en todos ellos que se pudo identificar ocho bandas distintas y bien definidas entre aproximadamente 71 y 14 kDa; el peso molecular estimado de estas bandas es de 71, 65, 51, 48, 44, 33, 19, y 14 kDa. Indican asimismo que, los patrones electroforéticos todas las muestras de harina y aislados proteicos de *L. albus* de Brasil determinados en dicho estudio fueron idénticos, presentando ocho bandas electroforéticas con pesos moleculares entre aproximadamente 14 y 71 kDa; señalan también que estos patrones de migración fueron similares a los obtenidos en muestras de harina de semillas de *L. albus* de un cultivar de Portugal analizado en dicho estudio.



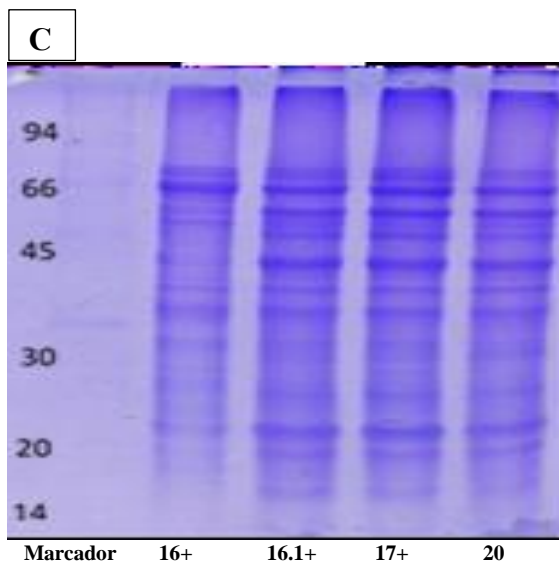
Leyenda A:

- 1 Andenes 80
- 2 Andenes INIA
- 3 Altagracia
- 4 Cajamarca
- 5 Cholo fuerte
- 6 Compuesto blanco semiprecoz
- 7 H6-INIA B/N
- 8 H6-INIA B/P



Leyenda B:

- 9 Huallanca
- 11 Huánuco 1
- 12 Huánuco 2
- 13 Lircay
- 14 Moteado Beige
- 15 Paton Grande
- 16 Puno 2 Blanquita



Leyenda C:

- 16+ Yanamucllo 008-1
- 16.1+ Yanamucllo 008-3
- 17+ Yanamucllo PLGO
- 20 Yunguyo

Figura 14: Perfil electroforético de los 20 ecotipos de tarwi desamargado

4.5.3 Estimación de rangos de peso molecular de las fracciones proteicas de los 20 ecotipos de tarwi en estudio

Como se aprecia en las Figuras 13 y 14, todos los 20 ecotipos presentan similar patrón electroforético. En la Tabla 11 se observa el número de bandas por rango de peso molecular para cada ecotipo, notándose que este número es similar en casi todos los ecotipos, fluctuando entre tres y cuatro bandas, con excepción del rango 67 – 91 kDa en donde no aparece ninguna banda. Se detectaron bandas mejor diferenciadas entre aproximadamente 14 y 66 kDa. Sin embargo, se aprecia una banda por encima de los 90 kDa, la que podría ser de γ -conglutina, ya que Muñoz *et al.* (2018) presentan el perfil electroforético SDS-PAGE de la γ -conglutina purificada obtenida de muestra de semillas de *L. mutabilis* procedente de Ecuador, en el que se aprecia bandas con pesos moleculares próximos 100 kDa y por encima de aproximadamente 70 kDa.

Tabla 11: Número de bandas por rango de peso molecular (PM)

Ecotipo	Rango de PM (kDa)				
	14 - 27	28 - 42	43 - 66	67 - 91	92 – 104
Andenes 80	4	3	3	Ausencia de bandas	1
Andenes INIA	4	3	4		1
Altagracia	3	3	4		1
Cajamarca	4	3	4		1
Cholo Fuerte	4	3	4		1
Comp. Blco. Semiprecoz	4	3	5		1
H6-INIA B/N	3	3	2		1
H6-INIA B/P	2	3	2		1
Huallanca	1	3	3		1
Huánuco 1	3	3	3		1
Huánuco 2	1	3	3		1
Lircay	1	4	4		1
Moteado Beige	2	3	3		1
Paton Grande	1	3	4		1
Puno 2 Blanquita	1	3	3		1
Yanamucllo 008-1	3	3	4		1
Yanamucllo 008-3	2	3	6		1
Yanamucllo PLGO	4	3	6		1
Yunguyo	3	3	5		1

La mayoría de las fracciones separadas estuvieron dentro de un rango de peso molecular entre 14 y 66 KdA; similares resultados reportan Muranyi *et al.* (2016) en muestras de *Lupinus angustifolius*, encontrando fracciones proteicas de las conglutininas con pesos

moleculares entre 4 y 70 Kda bajo condiciones reductoras; mientras que Mazumder *et al.* (2021) mencionan haber detectado bandas en el rango de 3.5 a 150 kDa en seis cultivares de *L. angustifolius* y tres cultivares de *L. albus*. En todos los ecotipos analizados en la presente investigación, también se observa bandas por encima los 55 kDa, inclusive por encima de 100 kDa; algunas de estas bandas podrían ser de β -conglutina ya que, como indican Santos *et al.* (1977) citados por Carvajal-Larenas (2016), en el *L. mutabilis* “Potosí” e “Inti” existen más de 20 cadenas de polipéptidos sin enlace disulfuro, con pesos moleculares de 15 a 65 kDa, conformadas por siete cadenas mayores de polipéptidos con peso molecular de 50 a 67 kDa, dos cadenas de 33 a 38 kDa, y varias de menor tamaño. Muranyi *et al.* (2016) también reportan en el *L. angustifolius* bandas correspondientes a la β -conglutina entre 54 y 72 kDa, e indica que hay que tener en cuenta que los datos acerca del tamaño y la cantidad de las diferentes fracciones varían en función del método y condiciones de separación empleados para el aislamiento de las proteínas, entre ellos el pH, el grado de salinidad, la temperatura, etc.; también, el contenido y la asociación de las subunidades que conforman las fracciones proteicas dependen fuertemente del estado de maduración de la semilla.

Las bandas de menor tamaño, por debajo de 45 kDa podrían ser fracciones derivadas de la γ -conglutina; según Carvajal-Larenas *et al.* (2016), esta proteína ha sido reportada en *L. albus* y *L. mutabilis* “Potosí” e “Inti”, y consta de una subunidad simple (monómero) de 42-43 kDa compuesta por dos cadenas polipeptídicas de 18-30 kDa unidas por enlaces disulfuro, las que se escindirían tras la reducción mediante la electroforesis PAGE-SDS; además indica que no se reporta en *L. mutabilis* la δ -conglutina, globulina rica en enlaces disulfuro, que sí se presenta en otras especies como *L. luteus* y *L. angustifolius*, esta conglutina de 14 kDa está compuesta por dos sub-unidades de 9.401 y 4.597 kDa unidas por enlaces disulfuro.

Varias de las fracciones determinadas en estos 20 ecotipos de tarwi en estudio podrían haberse derivado también de la reducción de la α -conglutina ya que, según Santos *et al.* (1977) citado por Carvajal-Larenas (2016), en el *L. mutabilis* “Potosí” esta proteína está formada por cuatro tipos principales de subunidades (50-65 kDa) y dos menores (40-42 kDa), las cuales después de la reducción producen un número indeterminado de cadenas de polipéptidos mayores y dos menores de 18 y 19 kDa; mientras que, el *L. mutabilis* “Inti” consiste de cinco tipos principales de cadenas de polipéptidos (32, 40, 45, 49 y 53 kDa), los cuales después de la reducción producen cuatro cadenas principales de polipéptidos (18, 19,

31 y 37 kDa). Albe-Slabi *et al.* (2022) también reportan haber detectado bandas de 19-46 kDa atribuidas a subunidades de α -conglutina en *L. albus* (Figura 2).

4.6 TOCOFEROLES

En la Tabla 12 y Figura 15 se presenta el contenido promedio de tocoferoles de cada ecotipo, tanto amargo como desamargado. En cuanto al contenido de tocoferoles, se puede observar que, el promedio de los 20 ecotipos del tarwi desamargado (319.76 mg/kg MS) es mayor que el del tarwi amargo (209.22 mg/kg MS); en el caso de las muestras amargas, el mayor contenido se obtuvo en el ecotipo Huánuco 1 (249.79 mg/kg MS) y el menor valor en el ecotipo H6 INIA B/P (175.17 mg/kg MS); mientras que, en las muestras desamargadas, el mayor valor se presentó en el ecotipo Andenes 80 (378.22 mg/kg MS) y el menor valor en el ecotipo Pallasca (256.00 mg/kg MS). No se encontró diferencia estadística significativa entre los ecotipos desamargados cuyos contenidos de tocoferoles estuvieron por encima de los 310 (rango: 315.00-370.91), pero sí entre estos y el resto de ecotipos (rango: 259.74-306.78). Por otro lado, en todos los ecotipos de tarwi se encontró un mayor contenido de tocoferoles en las muestras desamargadas que en las amargas, encontrándose diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre las muestras amargas y las desamargadas sólo en los ecotipos Altagracia, Andenes INIA, Cholo fuerte, Compuesto blanco semiprecoz, H6-INIA B/N, Huallanca, Huánuco 1, Moteado beige, Puno 2 blanquita, Yanamucllo 008-1 y Yanamucllo 008-3.

La diferencia en el contenido de tocoferoles entre la semilla amarga y la desamargada se debería a que, producto del desamargado se pierde una importante cantidad de sólidos solubles como proteínas solubles, algunos compuestos fenólicos, alcaloides, carbohidratos solubles, etc., lo cual implica una mayor concentración de los tocoferoles, los que son de naturaleza hidrofóbica y, por lo tanto, no se solubilizarían durante el proceso de desamargado (remojo 12 horas, cocción 1 hora y remojo con lavadas sucesivos diarios durante cinco días). Valores similares reportan Brandolini *et al.* (2022) para muestras desamargadas de *L. mutabilis*, ecotipos Altagracia, Andenes y Yunguyo: 281.4, 309.8 y 396.6 mg/kg MS, respectivamente, con un promedio entre estos tres de 329.27 mg/kg MS, muy similar al promedio de los 20 ecotipos analizados en este trabajo, 319.76 mg/kg MS. También, Czubinski *et al.* (2021) mencionan un valor 172.60 mg/kg MS de contenido de tocoferoles en semillas amargas de *L. mutabilis* cultivado en una estación experimental en Przebedowo

(Polonia); mientras que, Boschin y Arnoldi (2011) indican un valor de 103 mg/kg MS de γ -tocoferol en semillas amargas de *L. mutabilis* Andino 450 procedente de Ecuador.

Tabla 12: Contenido promedio de tocoferoles (mg/kg MS) en los 20 ecotipos de tarwi amargo y desamargado

Ecotipo	Tocoferoles Amargo	Tocoferoles Desamargado	Significancia entre amargo y desamargado
Alta gracia	189.64 (\pm 4.54) ^{ghi}	306.78 (\pm 2.14) ^{cdefg}	*
Andenes 80	221.44 (\pm 6.91) ^{cde}	378.22 (\pm 16.98) ^a	n.s.
Andenes-INIA	214.05 (\pm 6.15) ^{cdefg}	353.52 (\pm 10.64) ^{abcde}	*
Cajamarca	229.64 (\pm 3.07) ^{abc}	351.32 (\pm 28.30) ^{abcde}	n.s.
Cholo fuerte	213.92 (\pm 5.99) ^{cdefg}	317.55 (\pm 1.79) ^{abcdefg}	*
Compuesto blanco semiprecoz	194.50 (\pm 3.72) ^{efghi}	297.47 (\pm 4.21) ^{efg}	*
H6 INIA B/N	207.04 (\pm 6.35) ^{cdefgh}	318.40 (\pm 13.94) ^{gh}	*
H6 INIA B/P	175.17 (\pm 2.95) ^{hi}	259.74 (\pm 24.55) ^{gh}	n.s.
Huallanca	182.28 (\pm 5.83) ^a	268.50 (\pm 14.32) ^{fgh}	*
Huánuco 1	249.79 (\pm 6-75) ^{abc}	340.05 (\pm 4.52) ^{abcde}	*
Huánuco 2	229.82 (\pm 10.55) ^{efghi}	370.91 (\pm 5.71) ^{ab}	n.s.
Lircay	194.49 (\pm 6.54) ^{cdefgh}	304.30 (\pm 18.91) ^{defg}	n.s.
Moteado Beige	199.14 (\pm 7.17) ^{bcd}	315.00 (\pm 17.26) ^{bcdefg}	*
Pallasca	207.22 (\pm 5.78) ^{defghi}	256.00 (\pm 16.10) ^{gh}	n.s.
Patón Grande	248.83 (\pm 6-15) ^{cdefgh}	363.31 (\pm 33.01) ^{abcd}	n.s.
Puno 2 Blanquita	222.00 (\pm 2.44) ^{bcd}	331.26 (\pm 1.01) ^{abcdef}	*
Yanamuclo 008-1	194.81 (\pm 7.42) ^{defghi}	301.53 (\pm 1.56) ^{defg}	*
Yanamuclo 008-3	184.34 (\pm 2.78) ^{hi}	294.10 (\pm 13.90) ^{efg}	*
Yanamuclo-PLGO	209.13 (\pm 13.46) ^{cdefgh}	298.13 (\pm 11.75) ^{efg}	n.s.
Yunguyo	217.21 (\pm 4.30) ^{cdef}	369.05 (\pm 32.94) ^{abc}	n.s.
Promedio \pm Error estándar	209.22 \pm 4.62	319.76 \pm 8.23	
Rango	175.17 – 249.79	256.00 – 378.22	
<u>Testigos</u>			
Dulce 7 - <i>L. albus</i>	153.53 (\pm 2.57) ^{jk}	222.71 (\pm 5.41) ^{hi}	*
Ares - <i>L. albus</i>	111.74 (\pm 7.9) ^{lm}	135.91 (\pm 2.89) ^{jk}	n.s.
Multitalia - <i>L. albus</i>	138.53 (\pm 5.47) ^{kl}	171.28 (\pm 8.33) ^{ij}	n.s.
Boregine - <i>L. angustifolius</i>	91.85 (\pm 5.29) ^m	103.22 (\pm 5.70) ^k	n.s.
<i>L. luteus</i>	190.52 (\pm 12.11) ^{fghi}	260.82 (\pm 11.80) ^{gh}	n.s.

Valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

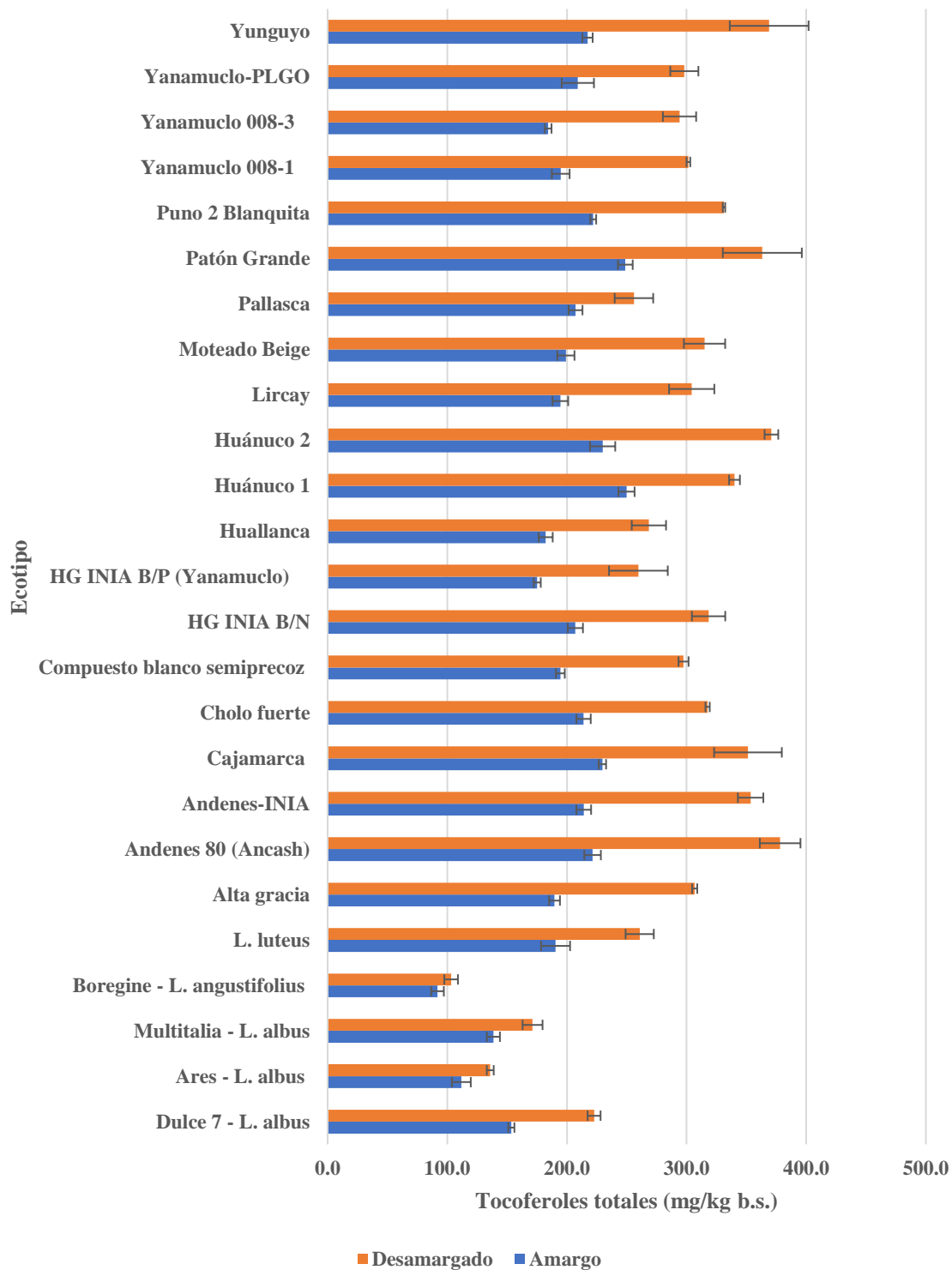


Figura 15: Contenido total de tocoferoles en los 20 ecotipos de tarwi

Por otro lado, el contenido de tocoferoles promedio de los 20 ecotipos desamargados (319.8 mg/kg MS) es superior al determinado en las muestras de comparación o testigo *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus* con valores de 103.22 y 260.82 mg/kg MS para *L. angustifolius* y *L. luteus*, respectivamente, y entre 135.91 y 222.71 en el *L. albus*; asimismo, es superior al

valor reportado para *L. albus* por Annichiarico *et al.* (2014), 107-153 mg/kg MS y por Boschini y Arnoldi (2011), 63.2-134.0 mg/kg MS; así como para el *L. angustifolius*, 73.5-95.4 mg/kg MS (Boschini y Arnoldi, 2011); para el *L. luteus* en muestras de España, domesticado y no domesticado, 22.7 mg/kg MS y 14.5 mg/kg MS respectivamente (Fernández-Marín *et al.* 2014).

En conclusión, hay una clara diferencia en el contenido de tocoferoles entre las diferentes especies de lupino, siendo el *L. mutabilis* el que presenta el mayor contenido. Asimismo, se aprecia diferentes valores dentro de una misma especie entre los diversos cultivares y/o ecotipos, diferencias debidas a las variables condiciones de cultivo y condiciones ambientales, características de cada país y de cada región dentro de un mismo país, como es el caso de las diferencias que se observan entre los ecotipos analizados en la presente investigación. Por otro lado, el *L. mutabilis* muestra un mayor contenido de tocoferoles que otros granos (72.87 mg/kg) y otra clase de productos como cereales (13.73 mg/kg), semillas (136.95 mg/kg), verduras (16.42 mg/kg), frutas (7.44 mg/kg), carnes (7.37 mg/kg), huevos (19.78 mg/kg) (Miyazawa *et al.* 2011).

4.7 CAROTENOIDES

Con respecto al contenido de carotenoides, se presentan bajos y similares valores promedio de los 20 ecotipos entre las semillas amargas y las desamargadas, 1.69 mg/kg MS y 1.70 mg/kg MS, respectivamente (Tabla 13, Figura 16), siendo el ecotipo Yunguyo el de mayor contenido con 3.00 mg/kg MS y el ecotipo HG INIA B/P el de menor contenido con 0.78 mg/kg MS, en el caso de las muestras desamargadas, estos dos ecotipos también presentan el mayor y menor contenido con respecto a las semillas amargas, 2.89 mg/kg MS y 0.71, respectivamente. El rango de variación entre los 20 ecotipos para carotenoides totales es estrecho, 0.71-2.89 mg/kg MS y 0.78-3.00 mg/kg MS para las muestras amargas y desamargadas, respectivamente. El contenido de carotenoides fue ligeramente mayor en las muestras desamargadas que en las muestras amargas; sin embargo, en la mayoría de ecotipos no se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre las muestras amargas y las desamargadas, con excepción de los ecotipos Andenes 80, Cajamarca, Pallasca, Yanamucllo 008-1 y Yanamucllo 008-3. Por otro lado, en los ecotipos Andenes 80, Compuesto blanco semiprecoz, H6-INIA B/N, Huánuco 1, Huánuco 2, Pallasca, Paton grande y Puno 2 blanquita se encontró una ligera mayor concentración de carotenoides en las muestras

amargas que en las desamargadas, aunque no se detectó diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) en estas muestras entre las amargas y las desamargadas. Se podría decir entonces que, el contenido de carotenoides se mantuvo casi constante después del proceso de desamargado.

Tabla 13: Contenido promedio de carotenoides (mg/kg MS) en los 20 ecotipos de tarwi amargo y desamargado

Ecotipo	Carotenoides Amargo	Carotenoides Desamargado	Significancia entre amargo y desamargado
Alta gracia	1.29 (± 0.02) ^{ijkl}	1.52 (± 0.01) ^{cdefg}	n.s.
Andenes 80	1.49 (± 0.03) ^{hijk}	1.13 (± 0.02) ^a	*
Andenes-INIA	1.99 (± 0.01) ^{efghi}	2.02 (± 0.04) ^{abcde}	n.s.
Cajamarca	1.44 (± 0.00) ^{ijk}	1.91 (± 0.05) ^{abcde}	*
Cholo fuerte	1.74 (± 0.05) ^{ghij}	1.96 (± 0.00) ^{abcdefg}	n.s.
Compuesto blanco semiprecoz	2.39 (± 0.05) ^{de}	2.27 (± 0.01) ^{efg}	n.s.
H6 INIA B/N	2.14 (± 0.08) ^{efg}	1.99 (± 0.06) ^{abcdefg}	n.s.
H6 INIA B/P	0.71 (± 0.02) ^m	0.78 (± 0.03) ^{gh}	n.s.
Huallanca	0.69 (± 0.04) ^m	0.68 (± 0.07) ^{fgh}	n.s.
Huánuco 1	1.51 (± 0.05) ^{hijk}	1.46 (± 0.07) ^{abcde}	n.s.
Huánuco 2	1.83 (± 0.07) ^{efghij}	1.76 (± 0.01) ^{ab}	n.s.
Lircay	0.87 (± 0.03) ^{lm}	0.90 (± 0.01) ^{defg}	n.s.
Moteado Beige	1.53 (± 0.07) ^{hijk}	1.54 (± 0.05) ^{bcdefg}	n.s.
Pallasca	1.81 (± 0.00) ^{fghij}	1.70 (± 0.00) ^{gh}	*
Patón Grande	2.33 (± 0.09) ^{ef}	2.11 (± 0.26) ^{abcd}	n.s.
Puno 2 Blanquita	2.03 (± 0.09) ^{efgh}	1.67 (± 0.11) ^{abcdef}	n.s.
Yanamuclo 008-1	1.64 (± 0.06) ^{ghij}	1.71 (± 0.05) ^{defg}	*
Yanamuclo 008-3	1.80 (± 0.03) ^{fghij}	2.14 (± 0.05) ^{efg}	*
Yanamuclo-PLGO	1.58 (± 0.16) ^{hij}	1.73 (± 0.12) ^{efg}	n.s.
Yunguyo	2.89 (± 0.08) ^d	3.00 (± 0.01) ^{abc}	n.s.
Promedio \pm Error estándar	1.69 \pm 0.12	1.70 \pm 0.12	
Rango	0.69 – 2.89	0.68 – 3.00	
<u>Testigos</u>			
Dulce 7 - <i>L. albus</i>	5.26 (± 0.12) ^b	7.14 (± 0.25) ^{hi}	n.s.
Ares - <i>L. albus</i>	1.90 (± 0.49) ^{efghi}	1.60 (± 0.03) ^{jk}	n.s.
Multitalia - <i>L. albus</i>	4.58 (± 0.01) ^c	4.27 (± 0.49) ^{ij}	n.s.
Boregine - <i>L. angustifolius</i>	6.49 (± 0.37) ^a	5.55 (± 0.13) ^k	n.s.
<i>L. luteus</i>	0.99 (± 0.10) ^{klm}	1.05 (± 0.10) ^{gh}	n.s.

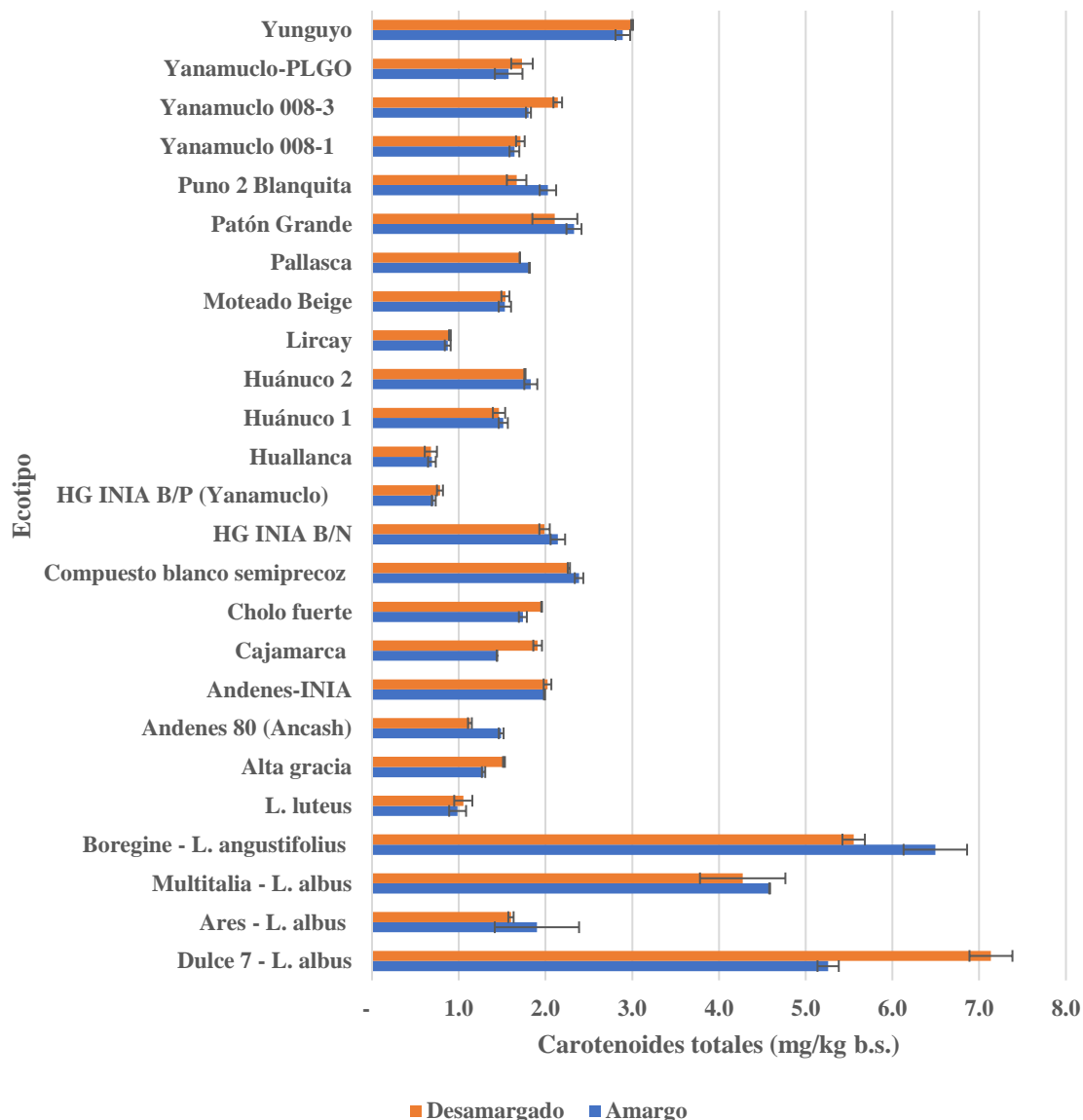


Figura 16: Contenido total de carotenoides en los 20 ecotipos de tarwi

Existe escasa la información en cuanto al contenido de carotenoides en el lupino, y, específicamente, en el tarwi (*L. mutabilis*); Multari *et al.* (2018) indican que se ha realizado muy poca investigación para determinar el contenido de carotenoides del lupino. Brandolini *et al.* (2022) reportan un contenido de carotenoides de 1.20 mg/kg MS, 1.40 mg/kg MS y 1.40 mg/kg MS en muestras de tres cultivares de *L. mutabilis*: Altagracia, Andenes y Yunguyo, respectivamente, valores muy similares a los encontrados en la presente investigación: 1.29 mg/kg MS, 1.49 mg/kg MS y 2.89 mg/kg MS en los ecotipos Altagracia, Andenes 80 y Yunguyo, respectivamente. También, Villacrés *et al.* (2020b) y Czubinski *et*

al. (2021) mencionan para el *L. mutabilis* amargo contenidos de 4.5 mg/kg MS y 3.10 mg/kg MS, respectivamente.

Comparados con los valores obtenidos en las muestras testigo, los contenidos del *L. mutabilis* son ligeramente superiores al *L. luteus*, pero ligeramente inferiores al *L. albus* y *L. angustifolius*; aunque, entre las muestras control de los cultivares de *L. albus* se encontraron valores significativamente diferentes, 7.14 mg/kg MS en el cultivar Dulce y 1.60 mg/kg MS en el cultivar Ares. Fernández-Marín *et al.* (2014) mencionan contenidos de 4.10 mg/kg MS y 7.50 mg/kg MS en los cultivares de *L. luteus* domesticado y no domesticado, respectivamente, mientras que El-Difrawi y Hudson (1979) encontraron 4.7 mg/kg en *L. albus*. Por otro lado, Guemes-Vera *et al.* (2012) muestran valores de contenido de carotenoides de 680 mg/kg MS, 1240 mg/kg MS y 450 mg/kg MS en las especies de *L. albus*, *L. bakeri* y *L. montanus*, valores bastante elevados, comparados con los obtenidos en el *L. mutabilis*; estas muestras reportadas por Guemes-Vera *et al.* (2012) indican que fueron cultivadas en la región central de México.

El ecotipo Yunguyo es el que presentó el mayor contenido de carotenoides, tanto en las muestras amargas como en las desamargadas (2.89 y 3.00, respectivamente), encontrándose diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre ellos y los demás ecotipos, cuyos valores fluctuaron entre 0.69 y 2.39 en las muestras amargas y entre 0.69 y 2.27 en las desamargadas.

En conclusión, el contenido de carotenos en el tarwi (*L. mutabilis*) es variable entre los diversos ecotipos y entre las otras diversas especies testigo, dándose variaciones significativas, dependiendo de la especie, y dentro de la especie, de la región y de las condiciones de crecimiento del cultivo. En general, el contenido de carotenoides en *L. mutabilis* fue menor comparado con otras especies de lupino.

4.8 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Debido a que, en la dieta del consumidor sólo se puede incluir tarwi desamargado, ya que en el producto amargo están presentes compuestos tóxicos, es muy valioso el conocimiento de la capacidad antioxidante en las semillas desamargadas. Por esta razón, se continuó la investigación sólo con las semillas desamargadas.

En la Tabla 14 se muestran los resultados del valor medio (\pm error estándar) de la capacidad antioxidante (mmol TE/Kg MS) de las semillas desamargadas de los 20 ecotipos de tarwi y de las muestras testigo. Como se puede observar, con los cuatro métodos aplicados para determinar la capacidad antioxidante, el tarwi (*L. mutabilis*) presenta mayor capacidad antioxidante que las muestras testigo de *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, siendo los valores mucho mayores que las muestras de *L. albus* y *L. angustifolius*. El promedio de la capacidad antioxidante (mmol TE/Kg MS) en el caso del *L. mutabilis* fue de 2.53, 40.17, 2.63 y 18.41 con los métodos PR, ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente mientras que, en el caso del *L. albus* fue 1.03, 7.41, 0.34 y 2.30; en el *L. angustifolius*, 0.89, 9.23, 0.50 y 5.08; y en el *L. luteus*, 4.01, 31.34, 0.86 y 12.44; el *L. luteus* es el que está más cerca a los valores del *L. mutabilis*. Con los métodos RP y FRAP no se ha encontrado reportes sobre la actividad antioxidante del *L. mutabilis*.

Tabla 14: Valor medio \pm error estándar de la capacidad antioxidante (mmol TE/Kg MS) de las semillas desamargadas de los 20 ecotipos de tarwi y de las muestras testigo

Método	<i>L. mutabilis</i>	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>
Poder reductor (PR)	2.65 \pm 0.30	1.03 \pm 0.52	0.89 \pm 0.03	4.01 \pm 0.75
ABTS	(1.09 – 6.25)	(1.44 – 3.10)		
	45.03 \pm 3.59	7.41 \pm 6.26	9.23 \pm 0.70	31.34 \pm 1.13
DPPH	(17.25 – 74.27)	(2.36 – 21.98)		
	7.21 \pm 0.48	2.69 \pm 0.48	1.48 \pm 0.12	5.54 \pm 0.07
FRAP	(6.03 – 8.53)	(1.88 – 3.53)		
	21.66 \pm 0.38	2.30 \pm 0.38	5.08 \pm 0.15	12.44 \pm 0.06
	(10.64 – 30.90)	(3.90 – 5.21)		

Entre paréntesis, el rango de valores de los diferentes ecotipos

Para el *L. albus*, diferentes investigadores reportan valores bastante diferentes de capacidad antioxidante determinados con el método FRAP, así, Fernández-Orozco *et al.* (2008), citados por Karamac *et al.* (2018), indican 71.4 mmol TE/Kg MS; Karamac *et al.* (2018) reportan un rango de 53 a 123 mmol TE/Kg MS; Vollmanova *et al.* (2021), quienes analizaron cuatro genotipos diferentes, menciona 1.33 a 6.07 mmol TE/Kg MS; los valores encontrados en la presente investigación con este método FRAP, 3.90-5.21 mmol TE/Kg MS están más cercanos a los reportados por Vollmanova *et al.* (2021). En el *L. angustifolius* se determinó un valor de 5.08 mmol TE/Kg MS, valor bastante diferente al mencionado por Martínez-Villaluenga *et al.* (2020) citados por Karamac *et al.* (2018), 43-48 mmol TE/Kg MS.

Con el método ABTS, Córdova-Ramos *et al.* (2020b) reportan valores parecidos para el *L. mutabilis* (ecotipos Altagracia, Andenes y Yunguyo), entre 72.15 y 76.58 mmol TE/Kg MS, mientras que Chirinos *et al.* (2013) muestran un valor de 202.70 mmol TE/Kg MS, pero no indican el ecotipo de *L. mutabilis*; la diferencia podría ser debido a que Chirinos *et al.* (2013) analizaron un ecotipo diferente y que trabajaron con la semilla hervida procedente de tres mercados regionales, por lo que no se reporta ni el tiempo ni las condiciones del hervido. Los valores reportados por Fernández-Orozco *et al.* (2008), citados por Karamac *et al.* (2018), para el *L. angustifolius* y el *L. albus*, 43.79 mmol TE/Kg MS y 71.4 mmol TE/Kg MS, respectivamente, también están cercanos a los determinados en el *L. mutabilis* en esta investigación; sin embargo, Vollmanova *et al.* (2021), quienes analizaron 11 muestras de *L. albus*, cultivadas en Eslovaquia, todas de diferentes países de origen (Francia, Chile, Polonia, Rumanía, Hungría, España, Rusia, Eslovenia, y Alemania, todas), reportan valores entre 5.7 mmol TE/Kg MS y 7.9 mmol TE/Kg MS, lo que indicaría que el clima, las condiciones de cultivo y otros factores estarían influyendo en la capacidad antioxidante de estas semillas.

La determinación de la capacidad antioxidante del *L. mutabilis* con el método DPPH arrojó valores entre 6.03 y 8.53 mmol TE/Kg MS, con un promedio de los 20 ecotipos de 7.21 mmol TE/Kg MS, valores bastante cercanos a los determinados por Córdova-Ramos *et al.* (2020b) en el *L. mutabilis* (Altagracia, Andenes, Yunguyo), entre 4.00 y 4.15 mmol TE/Kg MS, a diferencia de lo reportado por Chirinos *et al.* (2013), 277.5 mmol TE/Kg MS, pero que, como se mencionó, no indican el ecotipo de *L. mutabilis* ni las condiciones cómo las semillas fueron hervidas, además de ser procedentes de tres mercados regionales diferentes; asimismo, Gálvez-Ranilla *et al.* (2009), citado por Karamac *et al.* (2018), presentan valores mucho más altos para el *L. mutabilis* que los determinados en este trabajo, 56-149 mmol TE/Kg MS. Por otro lado, en las muestras testigo de *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus* se obtuvo valores mucho menores (0.34, 0.50 y 0.86 mmol TE/Kg MS, respectivamente) que los obtenidos en el *L. mutabilis* (6.06-8.53 mmol TE/Kg MS) en la presente investigación, aunque otros autores mencionan valores próximos al *L. mutabilis* en muestras de *L. albus*, 1.16-1.88 mmol TE/Kg MS (Vollmanova *et al.* 2021) y en muestras de *L. angustifolius*, 7.2 mmol TE/Kg MS (Czubinski *et al.* 2021).

Comparando los valores obtenidos de la capacidad antioxidante con cada método, y dos solventes de extracción diferentes para los métodos ABTS y DPPH entre los 20 ecotipos de lupino (Tabla 15, Figura 17), con el método RP se obtuvo un rango de 1.09-6.25 mmol TE/Kg

MS, con un promedio de 2.65 mmol TE/Kg MS; los mayores valores, por encima de 4 mmol TE/Kg MS, se presentaron en los ecotipos H6-INIA B/P, Lircay y Moteado beige. Con los métodos ABTS y DPPH se ensayaron dos solventes, hexano y metanol (meOH), siendo los resultados de capacidad antioxidante mayores cuando se usó metanol en el caso del ABTS y hexano en el caso del DPPH. Con el método ABTS (meOH) se obtuvo un rango más amplio de variación, de 17.25-74.27, con un promedio de 45.03 mmol TE/Kg MS, siendo los ecotipos Andenes 80, Altagracia, Andenes INIA, H6-INIA B/P, Lircay, Moteado beige y Puno 2 Blanquita los que presentaron los mayores valores, superiores a 50 mmol TE/Kg MS. Con el método DPPH (hexano) el rango de variación fue mucho más estrecho, todos los ecotipos estuvieron dentro del rango de 6.03 a 8.53 mmol TE/Kg MS, con un promedio de 7.21 mmol TE/Kg MS. Con el método FRAP, los valores estuvieron entre 10.64 y 30.90 mmol TE/Kg MS, con un valor promedio de 21.66 mmol TE/Kg MS; con este método, la mayoría de ecotipos presentaron un valor superior a 20 mmol TE/Kg MS, siendo los ecotipos Cajamarca, Cholo fuerte, Huallanca, Huánuco 1, Paton grande, Yanamucllo 008-3, Yanamucllo PLGO y Yunguyo los que presentaron valores menores al promedio. Entre los cuatro métodos se encuentran tendencias diferentes entre los diversos ecotipos, es decir con un determinado método algunos ecotipos presentan mayor valor que otros, mientras que con otro método no se da la misma tendencia. Por ejemplo, con el método ABTS (MeOH), el ecotipo Andenes es el que presenta mayor valor, 74.27 mmol TE/Kg MS y el menor valor se obtuvo en el ecotipo Huallanca, 17.25 mmol TE/Kg MS, mientras que, con el método RP, el mayor valor se obtiene en el ecotipo H6 INIA B/P, 6.65 mmol TE/Kg MS y el menor valor en el ecotipo Cholo fuerte, 1.09 mmol TE/Kg MS. Este fenómeno se aprecia entre los diferentes métodos para determinar la capacidad antioxidante, lo cual se podría deber, entre otros factores, a que cada método aplica diferentes condiciones de extracción de los compuestos antioxidantes para determinar la capacidad antioxidante; además, los diferentes ecotipos presentarían diferentes características de sus compuestos antioxidantes, entre los cuales se encuentran principalmente los compuestos fenólicos, pues según Krol et al. (2018), la capacidad antioxidante de estos compuestos depende mayormente de su estructura, especialmente del número y distribución de los grupos hidroxilo (-OH): el poder antioxidante de un compuesto dado es mayor cuando tiene dos grupos -OH en posición orto.

Tabla 15: Capacidad antioxidante de los 20 ecotipos de tarwi (Milimol Trolox equivalente/kg ms). Métodos PR (Poder Reductor), ABTS, FRAP y DPPH

Ecotipo	RP	ABTSme	ABTSex	DPPHme	DPPHex	FRAP
Altagracia	3.04 ± 0.00 ^{bcdefg}	51.46 ± 1.69 ^{cde}	8.76 ± 0.34 ^{ab}	2.55 ± 0.17 ^{cdefg}	7.51 ± 0.39 ^{abcde}	21.68 ± 0.00 ^d
Andenes 80	2.67 ± 0.00 ^{bcdefg}	74.27 ± 2.82 ^a	10.06 ± 1.02 ^a	4.41 ± 0.76 ^b	8.53 ± 0.13 ^a	27.43 ± 0.24 ^{bc}
Andenes INIA	2.41 ± 0.00 ^{defg}	66.75 ± 2.2 ^{ab}	9.90 ± 2.49 ^a	3.39 ± 0.05 ^{bcd}	7.94 ± 0.03 ^{abcd}	26.10 ± 0.26 ^{bc}
Cajamarca	2.46 ± 0.00 ^{cdefg}	31.65 ± 2.28 ^{hij}	8.39 ± 1.02 ^{ab}	2.70 ± 0.51 ^{cdefg}	7.52 ± 0.62 ^{abcde}	17.07 ± 0.66 ^{fg}
Cholo fuerte	1.09 ± 0.00 ^{fg}	37.31 ± 0.79 ^{ghi}	10.17 ± 2.61 ^a	1.93 ± 0.09 ^{fgh}	7.07 ± 0.71 ^{bcdef}	16.91 ± 1.21 ^{fg}
Compuesto blanco semiprecoz	3.08 ± 0.00 ^{bcdef}	49.45 ± 2.23 ^{def}	8.02 ± 1.01 ^{abc}	3.36 ± 0.94 ^{bcde}	7.56 ± 0.23 ^{abcde}	26.79 ± 0.25 ^{bc}
H6 INIA BN	1.74 ± 0.00 ^{efg}	44.84 ± 0.99 ^{efg}	10.00 ± 2.30 ^a	4.26 ± 0.29 ^b	6.73 ± 0.71 ^{cdefg}	24.93 ± 0.34 ^c
H6-INIA BP	6.65 ± 0.00 ^a	57.13 ± 3.73 ^{bcd}	7.09 ± 1.06 ^{abc}	6.47 ± 0.49 ^a	6.30 ± 0.00 ^{efg}	30.90 ± 1.24 ^a
Huallanca	2.27 ± 0.00 ^{defg}	17.25 ± 2.36 ^{lm}	7.60 ± 0.47 ^{abc}	1.91 ± 0.21 ^{fghi}	6.71 ± 0.30 ^{cdefg}	15.44 ± 0.06 ^g
Huanuco 1	1.44 ± 0.00 ^{efg}	22.26 ± 0.49 ^{jkl}	9.22 ± 1.50 ^{ab}	1.95 ± 0.13 ^{efgh}	8.04 ± 0.26 ^{abc}	17.67 ± 1.76 ^{fg}
Huanuco 2	3.25 ± 0.00 ^{bcde}	33.74 ± 1.79 ^{hi}	8.47 ± 0.62 ^{ab}	2.61 ± 0.07 ^{cdefg}	8.12 ± 0.34 ^{ab}	25.02 ± 0.80 ^c
Lircay	4.62 ± 0.00 ^{ab}	61.03 ± 0.80 ^{bc}	8.68 ± 0.58 ^{ab}	3.86 ± 0.38 ^{bc}	6.97 ± 0.22 ^{bcdef}	28.38 ± 1.35 ^{ab}
Moteado Beige	4.61 ± 0.00 ^{abc}	58.62 ± 6.28 ^{bcd}	8.33 ± 1.21 ^{ab}	4.17 ± 0.17 ^b	7.52 ± 0.08 ^{abcde}	27.65 ± 0.45 ^{bc}
Pallasca	2.34 ± 0.00 ^{defg}	29.66 ± 1.65 ^{ijk}	7.40 ± 0.16 ^{abc}	1.70 ± 0.35 ^{ghij}	6.22 ± 0.02 ^{efg}	10.64 ± 0.35 ^h
Paton grande	1.35 ± 0.00 ^{efg}	33.24 ± 1.69 ^{hi}	9.96 ± 2.09 ^a	2.71 ± 0.14 ^{cdefg}	7.16 ± 0.24 ^{abcdef}	18.83 ± 0.74 ^{ef}
Puno 2 blanquita	2.16 ± 0.00 ^{defg}	72.81 ± 1.10 ^a	8.57 ± 0.13 ^{ab}	3.58 ± 0.44 ^{bcd}	6.64 ± 0.38 ^{defg}	22.12 ± 0.23 ^d
Yanamuclo 008-1	2.55 ± 0.00 ^{bcdefg}	39.48 ± 2.87 ^{ghi}	6.96 ± 0.41 ^{abc}	2.26 ± 0.26 ^{defgh}	6.74 ± 0.06 ^{cdefg}	20.74 ± 0.43 ^{de}
Yanamuclo 008-3	1.86 ± 0.00 ^{defg}	40.14 ± 2.86 ^{fgh}	8.87 ± 2.93 ^{ab}	3.28 ± 0.26 ^{bcdef}	6.03 ± 0.19 ^{fg}	17.80 ± 0.75 ^{fg}
Yanamuclo PLGO	2.11 ± 0.00 ^{defg}	40.73 ± 3.57 ^{fgh}	7.03 ± 0.35 ^{abc}	3.12 ± 0.11 ^{bcdef}	7.04 ± 0.62 ^{bcdef}	18.60 ± 0.32 ^{ef}
Yunguyo	1.32 ± 0.00 ^{efg}	38.73 ± 2.50 ^{ghi}	9.58 ± 2.16 ^{ab}	2.37 ± 0.19 ^{defg}	7.83 ± 0.23 ^{abcd}	18.55 ± 0.71 ^{ef}
Testigos						
Dulce 7- <i>L. albus</i>	1.44 ± 0.15 ^{efg}	2.37 ± 0.60 ⁿ	5.95 ± 0.89 ^{abc}	1.40 ± 0.38 ^{ghijk}	2.65 ± 0.35 ^{hi}	3.90 ± 0.21 ⁱ
Ares- <i>L. albus</i>	3.10 ± 0.90 ^{bcdef}	20.14 ± 3.13 ^{kl}	4.10 ± 0.19 ^{bc}	0.38 ± 0.08 ^{jk}	1.88 ± 0.25 ⁱ	4.70 ± 0.05 ⁱ
Multitalia - <i>L. albus</i>	1.64 ± 0.33 ^{efg}	21.98 ± 1.58 ^{jkl}	5.34 ± 0.30 ^{abc}	0.26 ± 0.11 ^k	3.53 ± 0.22 ^h	5.22 ± 0.12 ⁱ
Boregine - <i>L. angustifolius</i>	0.89 ± 0.03 ^g	9.23 ± 0.70 ^{mn}	2.65 ± 0.12 ^c	0.50 ± 0.03 ^{ijk}	1.48 ± 0.12 ⁱ	5.08 ± 0.16 ⁱ
<i>L. luteus</i>	4.01 ± 0.75 ^{bcd}	31.34 ± 1.12 ^{hij}	7.23 ± 0.18 ^{abc}	0.86 ± 0.10 ^{hijk}	5.54 ± 0.07 ^g	12.44 ± 0.06 ^h

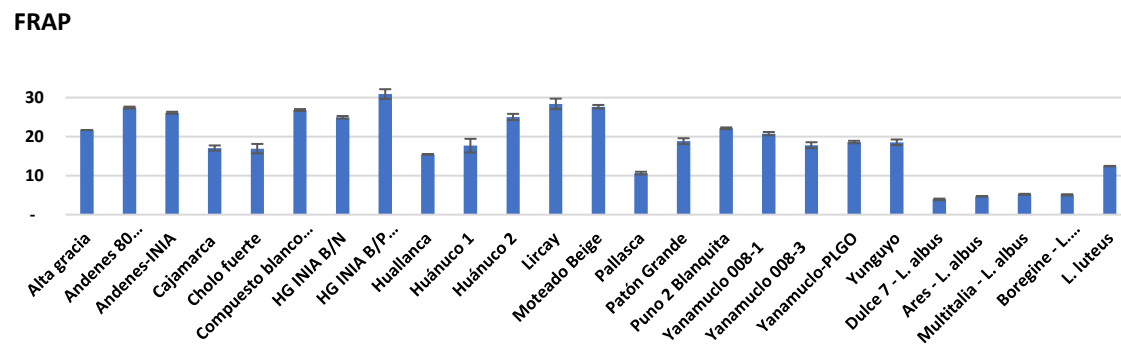
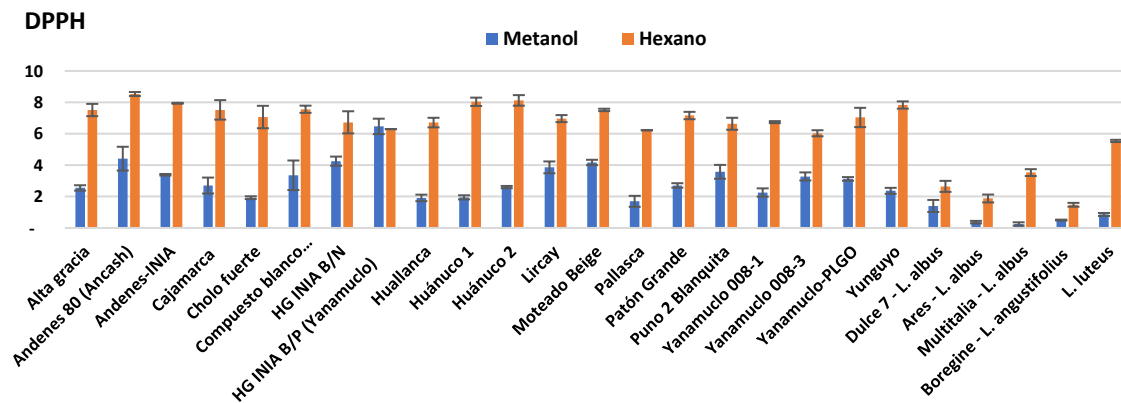
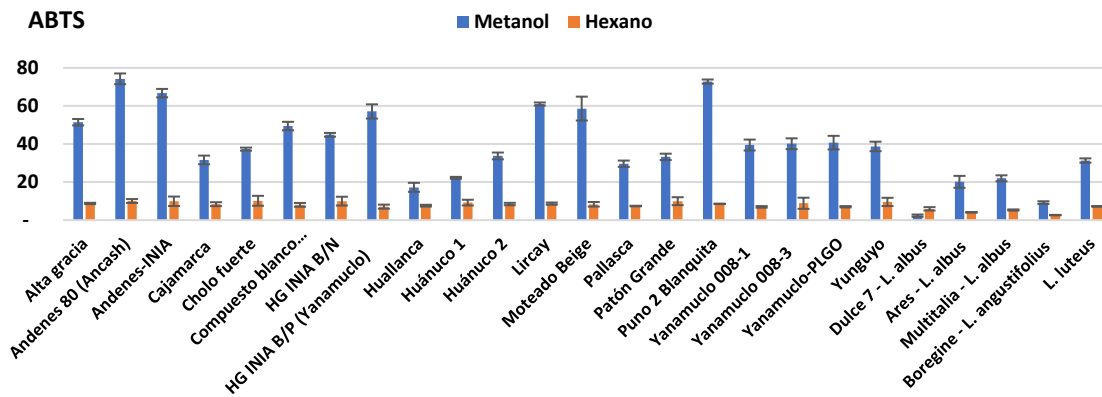
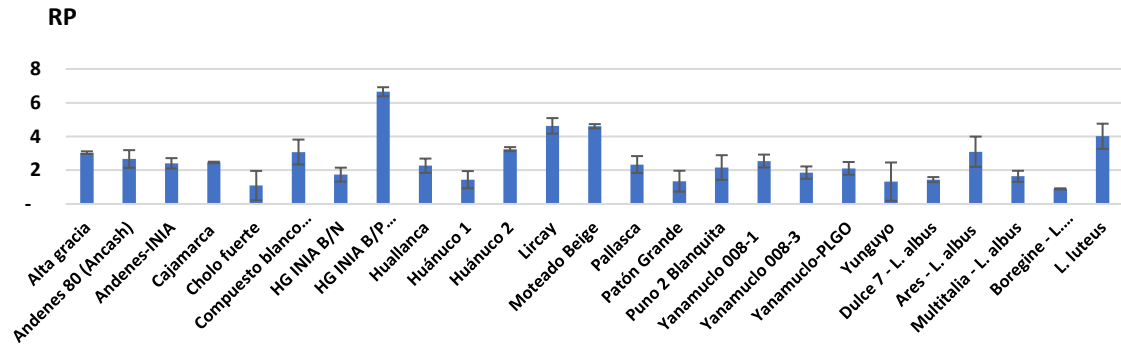


Figura 17: Capacidad antioxidante de los 20 ecotipos de tarwi (Milimol Trolox equivalente/kg ms)

Métodos PR (Poder Reductor), ABTS, DPPH y FRAP.

En conclusión, con respecto a los cuatro métodos aplicados, con el método RP se aprecia una mayor capacidad en los ecotipos H6-INIA B/P (6.65), Lircay (4.62) y Moteado beige (4.61), entre los cuales no se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), pero sí entre éstos y la mayoría del resto de los ecotipos, en los cuales la capacidad antioxidante RP fluctuó entre (1.09 y 3.25). Con el método ABTS_{me}, los ecotipos con mayor capacidad fueron Andenes 80 (74.27), Andenes INIA (66.75) y Puno 2 blanquita (72.81), no encontrándose diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre ellos, pero sí con la mayoría del resto de ecotipos, en los que los valores estuvieron entre 17.25 (Huallanca) y 61.03 (Lircay). Mientras que, con el método ABTS_{hex}, todos los valores fueron mucho menores (entre 7.03 en Yanamuco PLGO y 10.17 en Cholo fuerte) que con ABTS_{me}, no encontrándose diferencia significativa estadísticamente ($p < 0,05$) entre todos los ecotipos. Con respecto al método DPPHex, entre la mayoría de ecotipos que presentaron valores por encima de 7 (entre 7.16 y 8.53) no se detectó diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), pero sí entre estos y la mayoría del resto de ecotipos, lo que estuvieron en el rango de 6.03 y 7.07. En cuanto al método FRAP, no se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre los ecotipos que presentaron valores por encima de 26 (Andenes 80, Andenes INIA, Compuesto blanco semiprecoz, Lircay y Moteado beige), pero sí entre estos y la mayoría del resto (entre 10.64 y 25.02); el ecotipo H6-INIA B/P fue el que obtuvo el mayor valor (30.90), diferenciándose estadísticamente ($p < 0,05$) de todos los demás.

Finalmente, en cuanto al contenido proximal, tocoferoles, carotenoides y la capacidad antioxidante, en la Figura 18A del Análisis de Componentes Principales, se observa claramente que los testigos, con excepción del *L. luteus*, difieren significativamente de los ecotipos del tarwi (*L. mutabilis*). Dentro de los ecotipos de tarwi, se distinguen dos grupos que difieren también significativamente entre ellos; un grupo está conformado por Lircay, HG INIA B/P, Huánuco 2, Andenes INIA, Puno 2 blanquita y Andenes 80; el otro grupo está conformado por los 14 ecotipos restantes, dentro de los cuales se encuentra el testigo *L. luteus*. Asimismo, en la Figura 18 B se aprecia que los testigos *L. albus* y *L. angustifolius* presentan un mayor contenido de carotenoides y carbohidratos que los ecotipos de *L. mutabilis* y el testigo de *L. luteus*; mientras que, los ecotipos de tarwi y *L. luteus* presentan un mayor contenido de proteína, grasa, cenizas y una mayor capacidad antioxidante que los testigos *L. albus* y *L. angustifolius*.

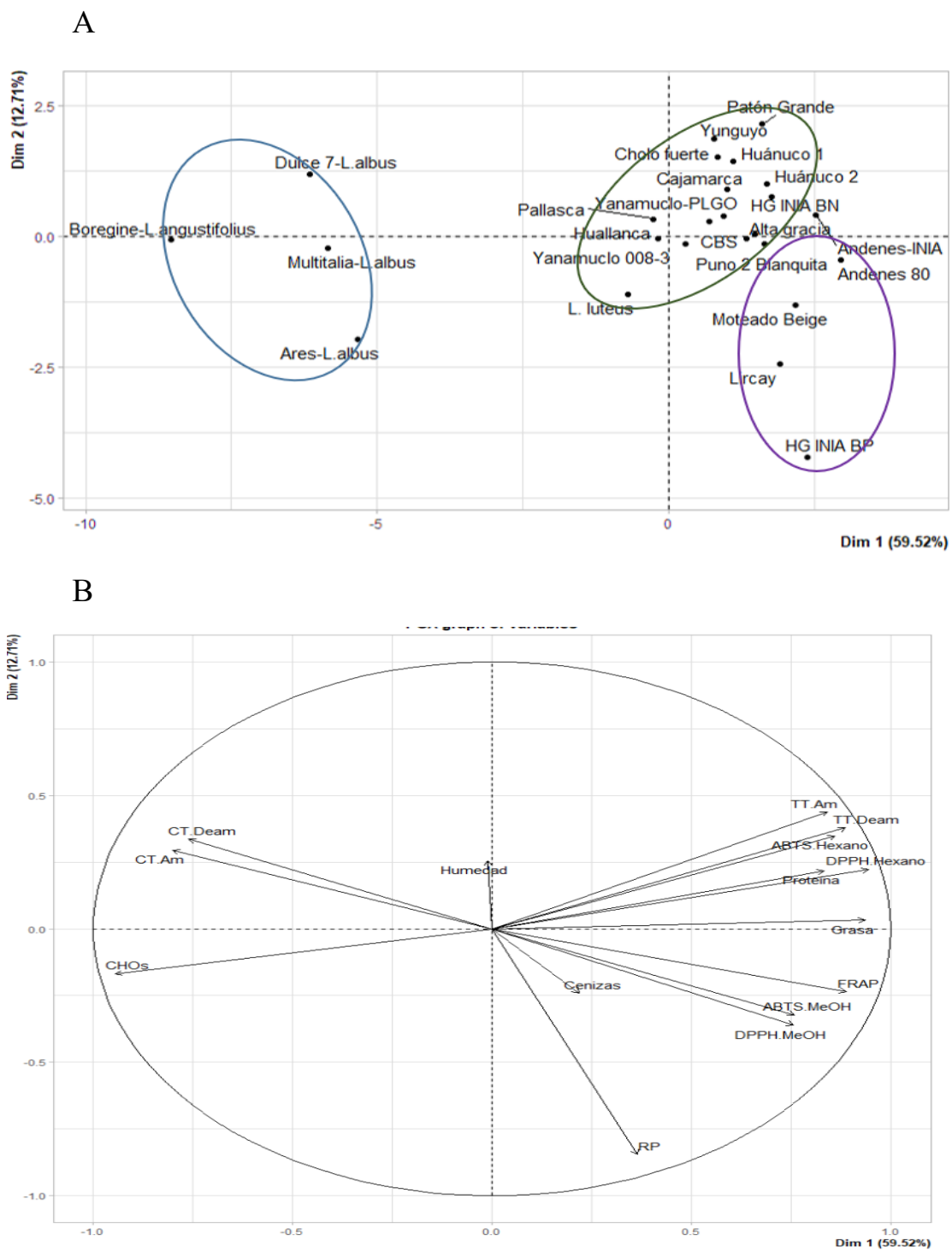


Figura 18: Análisis de componentes principales de los ecotipos de tarwi y testigos

V. CONCLUSIONES

1. Las características morfológicas de los veinte ecotipos estudiados varían forma, tamaño y color, sin embargo, las diferencias encontradas entre estos veinte ecotipos no son consideradas muy grandes, con algunas excepciones. Se encontró una predominancia de forma oblonga con tonalidades claras entre blanco y crema.
2. La composición fisicoquímica de los veinte ecotipos presentó una limitada variabilidad, con un alto contenido de proteína bruta ($N \times 6.25$), entre 35.60 y 44.50 por ciento (5.48 por ciento CV) y grasa bruta entre 14.16 y 18.55 (7.97 por ciento CV); estos valores están reportados en base húmeda, con un promedio de humedad de 9.91 por ciento (11.82 por ciento CV).
3. Existe una gran absorción de agua durante la hidratación en el proceso de desamargado, llegando a porcentajes de absorción por encima del 100 por ciento; estos valores de absorción de agua son variables entre los diversos ecotipos analizados.
4. Producto del desamargado, se produce una pérdida notable del contenido de sólidos solubles. En promedio estos valores fueron de 22.9 por ciento (19 por ciento CV) esto se explicó por la pérdida de componentes solubles durante el desamargado acuoso. Entre ellos alcaloides, sacáridos y algunas proteínas.
5. El contenido de proteína soluble disminuye en los veinte ecotipos producto del proceso de desamargado, con una pérdida estimada de 20.2 por ciento (24.1 por ciento CV). Esta pérdida resultó variable entre los diversos ecotipos.
6. Los veinte ecotipos de tarwi presentan un perfil electroforético de las fracciones proteicas bastante similar, tanto en los granos amargos como en los desamargados. Se logró identificar rangos de **peso molecular** de las diferentes fracciones proteicas detectadas mediante electroforesis SDS-PAGE. Los péptidos encontrados estuvieron en

los siguientes rangos: 14 – 27 kDa, 28 – 42 kDa, 43 – 66 kDa, y un péptido entre los 92 y 104 kDa.

7. Hay una clara diferencia en el contenido de tocoferoles entre los ecotipos amargos y desamargados de *L. mutabilis*. El proceso de desamargado produce una concentración de los componentes hidrofóbicos, tales como los tocoferoles (52.8 por ciento de incremento). Es de resaltar que, en comparación con los testigos (lupinos de otras especies), el tarwi desamargado presentó un mayor contenido de tocoferoles. Este contenido en los diferentes ecotipos de *L. Lupinus* fue variable entre los veinte ecotipos, y, dentro de una misma especie, entre los diversos cultivares.
8. El contenido de carotenoides en el tarwi (*L. mutabilis*) es variable entre los veinte ecotipos, pero las diferencias no son muy grandes; sin embargo, entre las diversas especies sí se dan variaciones mayores, dependiendo de la especie, y dentro de la especie, de la región y de las condiciones de crecimiento del cultivo. En general, el contenido de carotenoides en el *L. mutabilis* fue menor al de los testigos. En este caso, en el producto desamargado no se produce una concentración debido a su hidrofobicidad, sino más bien una pérdida debido a la degradación causada por la alta temperatura del proceso durante la cocción de los granos por una hora.
9. La capacidad antioxidante, expresada en mmol TE/Kg MS, determinada por los métodos ABTS y FRAP presentaron los valores más altos en comparación con los métodos RP y DPPH. Con los métodos ABTS y DPPH se ensayaron dos solventes, hexano y metanol (meOH), siendo los resultados de capacidad antioxidante mayores cuando se usó metanol en el caso del ABTS y hexano en el caso del DPPH. Cabe resaltar que, para los valores de DPPH con hexano, la variabilidad encontrada en los resultados para los diferentes ecotipos fue baja (9.5 % CV).
10. El tarwi (*L. mutabilis*) presenta una mayor riqueza en el contenido de proteínas, grasa, tocoferoles y capacidad antioxidante que los testigos (*L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*).

VI. RECOMENDACIONES

- Determinar la variación en el contenido de proteína total y proteína soluble, tanto en la semilla como en el agua usada, en cada una de las etapas durante el desamargado del tarwi por el método acuoso: remojo durante 12 horas, hervido por una hora, remojo y lavado durante cinco días.
- Estudiar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos después de la digestión en el tracto gastrointestinal.
- Estudiar la liberación de estos compuestos bioactivos de la compleja matriz del tarwi durante su digestión en el tracto gastrointestinal.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, O y Caiza, J. 2010. Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) a partir de harina integral. Revista Politécnica, 2010, Vol. 29(1): 7077.

Albe-Slabi, S.; Mesieres, O.; Mathé, C.; Ndiaye, M.; Galet, O.; Kapel, R. 2022. Combined Effect of Extraction and Purification Conditions on Yield, Composition and Functional and Structural Properties of Lupin Proteins. Foods, MDPI, 2022, 11,1646. <https://doi.org/10.3390/foods11111646>.

Amor, M. 2022. Influencia de la germinación en la obtención de aislados proteicos de altramuza. Trabajo de Fin de Grado. Grado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de Valencia. Valencia. España.

Amor, M. 2022. Influencia de la germinación en la obtención de aislados proteicos de altramuza. Trabajo de Fin de Grado. Grado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de Valencia. Valencia. España.

Annicchiarico, P.; Manunza, P.; Arnoldi, A.; Boschini, G. 2014. Quality of *Lupinus albus* (White Lupin) Seed: Extent of Genotypic and Environmental Effects. J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 6539-6545. [Dx.doi.org/10.1021/jf405615k1](https://doi.org/10.1021/jf405615k1)

AOAC. (2000). Methods 920.87, 923.05, 923.03, 925.10 In: Official Methods of Analysis. (17th ed.). The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K.; Özyürek, M.; Güçlü, K. 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem., Vol. 85, No. 5, pp. 957–998, 2013. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>

- Bartkiene E.; Bartkevics, V.; Starkute, V.; Krungleviciute, V.; Cizeikiene, D.; Zadeike, D.; Juodeikiene, G.; Maknickiene, Z. 2016. Chemical composition and nutritional value of seeds of *Lupinus luteus* L., *L. angustifolius* L. and new hybrid lines of *L. angustifolius*. *Zemdirbyyste-Agriculture*, vol. 103, N° 1 (2016), DOI 10.13080/z-a.2016.103.014.
- Benítez-Estrada, A.; Villanueva-Sánchez, J.; González-Rosendo, G.; Alcántar-Rodríguez, V.; Puga-Díaz, R. y Quintero-Gutiérrez, A. 2020. Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
- Berghout, J.A.M.; Boom, R.M.; Van der Goot, A.J. 2015. Understanding the differences in gelling properties between lupin protein isolate and soy protein isolate. *Food Hydrocolloids* 43: 465-472.
- Bhalodia, N.; Nariya, P.; Acharya, R.; Shukla, V. 2013. In vitro antioxidante activity of hydro alcoholic extract from the fruit Pulp of *Cassia fistula* Linn. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)* 2013 Apr; 34(2):209-14. doi: 10.4103/0974-8520.119684.
- Borja, J. (2014). “Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") mediante proteasas de *Bacillus* sp”. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.
- Boschin y Arnoldi. 2011. Legumes re valuable sources of tocopherols. *Food Chemistry* 127 (2011) 1199-1203. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.124
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Brandolini, A., Hidalgo, A., Gabriele, S., & Heun, M. (2015). Chemical composition of wild and feral diploid wheats and their bearing on domesticated wheats. *Journal of Cereal Science*, 63, 122-127. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.03.005>
- Brandolini, A.; Glorio-Paulet, P.; Estivi, L.; Locatelli, N.; Cordova-Ramos, J.; Hidalgo, A. (2022). Tocopherols, carotenoids and phenolics changes during Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) seeds processing. *Journal of Food Composition and Analysis* 106 (2022) 104335. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104335>.
- Caligari PDS, Rómer P, Rahim MA, Huyghe C, Neves-Martins J, Sawicka-Sienkiewicz EJ (2000). El potencial de *Lupinus mutabilis* como cultivo. En *Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century* (pp. 569-573) Springer, Dordrecht.
- Capraro, J.; Scarafoni, A.; Caramanico, R.; Mauro, M. 2014. Pasta supplemented with isolated lupin protein fractions reduces body weight gain and food intake of rats and decreases plasma glucosa concentration upon glucosa overload trial. *Food Funct*, 2014, 5, 375. DOI: 10.1039/c3fo60583c – Source: PubMed.
- Carvajal-Larenas, F.; Nout, M.; Van Boekel, M.; Koziol, M.; Linnemann, A. 2013. Modelling of the aqueous debittering process of *Lupinus mutabilis* Sweet. *Food Science and Technology* 53 (2013)507-516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.017>
- Carvajal-Larenas, F; Linnemann, A.; Nout, M.; Kozio, M.; Van Boekel, M. 2016. *Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:1454–1487 (2016). DOI: 10.1080/10408398.2013.772089.
- Castañeda, B.; Manrique, R.; Gamarra, F.; Muñoz, A.; Ramos, F.; Lizaraso, F. 2008. Probiótico elaborado en base a las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho or tarwi) seeds. *Acta Médica Peruana* 25: 210-215. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=96625405>

- Chirinos, R.; Pedreschi, R.; Rogez, H.; Larondelle, Y.; Campos, D. 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products* 47(2013) 145-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.25>.
- Chirinos-Arias, M. 2015. Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potential. *Revista Bio Ciencias*. 3(3): 163-172 <http://revistabiociencias.uan.edu.mx>. Consultada el 20.02.2017.
- Córdova-Ramos JS, Glorio-Paulet P, Camarena F, Brandolini A, Hidalgo A (2020a) Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): processing effects on chemical composition, heat damage and in vitro protein digestibility. *Cereal Chem* 97:827–835. <https://doi.org/10.1002/cche.10303>.
- Córdova-Ramos, J.; Glorio-Paulet, P.; Hidalgo, A.; Camarena, F (2020b). Efecto del proceso tecnológico sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales del lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) andino. *Scientia Agropecuaria* 11(2): 157 – 165 (2020). DOI: 10.17268/sci.agropecu.2020.02.02.
- Cortés-Avendaño, P.; Tarvainen, M.; Jukka-Pekka, S.; Glorio-Paulet, P.; Yang, B.; Repo-Carrasco-Valencia, R. 2020. Profile and content of residual alkaloids in ten ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after aqueous debittering process. *Plant Foods for Human Nutrition* (2020) 75:184–191. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00799-y>
- Crespo, J.; Rodríguez, J.; Vives, R.; James, J.; Reaño, M.; Daroca, P.; Burbano, C.; Muzquiz, M. 2001. Occupational IgE-mediated allergy after exposure to lupine seed flour. *J Allergy Clin Immunol*. August 2001: 295-297.
- Czubinski, J.; Gryeger, A.; Siger, A. 2021. *Lupinus mutabilis* seed composition and its comparison with other lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis* 99(2021) 103875. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103875>.

- Czubinski, J.; Wroblewska, K.; Czyzniejewski, M. 2019. Bioaccessibility of defatted lupin seed phenolic compounds in a standardized static in vitro digestion system. *Food Research International* 116: 1126-1134.
- Dooper, M.; Plassen, C.; Holden, L.; Lindvik, H.; Faeste, C. (2009). “Immunoglobulin E cross-reactivity between lupine conglutins and peanut allergens in serum of lupine-allergic individuals”. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; Vol. 19(4): 283-291.
- Duranti, M.; Consonni, A.; Magni, C.; Sessa, F.; & Scarafoni, A. (2008). The major proteins of lupin seed: Characterization and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 624-633. doi: 10.1016/j.tifs.2008.07.002
- Ecker C. and Cichna-Markl, M. 2012. Development and validation of a sandwich ELISA for the determination of potentially allergenic lupine in food. *Food Chemistry* 130:759-766. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611010752>. Consultado el 21.02.2017.
- El-Difrawi EA, Hudson BJ. 1979. Identificación y estimación de carotenoides en las semillas de cuatro Especies de *Lupinus*. *J Sci Food Agric* 30:1168-1170.
- Erbas, M. 2010. The effects of Different Debittering Methods on the Production of Lupin Bean Snack from Bitter *Lupinus albus* L. Seeds. *Journal of Food Quality* 33 (2010) 742-757. DOI: 10.11/j1745-4557.2010.00347.x
- Ertas, N. and Bilgiçli, N. (2014). Effect of different debittering processes on mineral and phytic acid content of lupin (*Lupinus albus* L.) seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 427 51(11), 3348-3354.
- Espejo, L. 2017. “Desarrollo del proceso común de desamargado de *Lupinus mutabilis* (tarwi) en condiciones controladas físicas y químicas”. Monografía para optar el grado académico de Licenciada en Ciencias Químicas. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Puras y Naturales. La Paz. Bolivia.

- FAO. 1993. Manual de Técnicas para Laboratorio de Nutrición de Peces y Crustaceos. Programa Cooperativo Gubernamental FAO – Italia. <https://www.fao.org/3/AB489S/AB489S00.htm#TOC>.
- FAO/OMS. 2006. Alergias Alimentarias. Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Nota Informativa INFOSAN N°3/2006.
- Fernández-Marín, B.; Milla, R.; Martín-Robles, N.; Arc, E.; Kranner, I.; Becerril, J.; García-Plazaola, J. 2014. Side-effects of domestication: cultivated legume seeds contain similar tocopherols and fatty acids but less carotenoids than their wild counterparts. *BMC Plant Biology* (2014) 14:1599. DOI 10.1186/s 12870-014-0385-1.
- Fernandez-Pachon, M.; Villano, D.; Troncoso, A. y Garcia-Parrilla, M. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *ALAN* [online]. 2006, vol.56, n.2 [citado 2022-07-02], pp.110-122. Disponible en: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000200002&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0004-0622.
- Fontanari, G.; Martins, J.; Kobelnik, M.; Pastre, I.; Gomes, J.; Batistuti, J.; Fertoni, F. 2012. Thermal studies on protein isolates of White lupin seeds (*Lupinus albus*). *J. Therm Anal Calorim* (2012) 108: 141-148. DOI: 10.1007/s10973-011-1898-6.)
- Gálvez-Ranilla, L.G.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. 2009. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 22(5): 397-404.
- Giulisano, A.; Alves, S.; Neves, J.; Trindade, L. 2019. Genetics and Breeding of *Lupinus mutabilis*: Na emerging Protein Crop. *Front. Plant Sci.* 10:1385. DOI:103389/fpls.2019.01385
- Gresta, F.; Wink, M.; Prins, U.; Abberton, M.; Capraro, J.; Scarafoni, A.; Hill, G. (2017). Lupins in European cropping systems. In D. Murphy-Bokern, F. Stoddard and C. Watson, *Legumes in cropping systems* (p. 88-108). Wallingford: CABI Publishing

- Gross, R.; Von Baer, E.; Koch, R.; Marquard, L.; Trugo, L. and Wink, M. 1988. Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low alkaloid content. *Journal of Food Composition and Analysis* 1: 353-361. http://www.researchgate.net/publication/229310116_Chemical_composition_of_a_new_variety_of_the_Andean_lupin_%28Lupinus_mutabilis_cv._Inti%29_with_low-alkaloid_content.
- Guemes-Vera, N.; Martínez-Herrea, J.; Hernandez-Chavez, J.; Yanez-Fernandez, J.; Totosaus, A. 2012. Comparison of Chemical Composition and Protein Digestibility, Carotenoids, Tanins and Alkaloids Content of Wild Lupinus Varieties Flour. *Pakistan Journal of Nutrition* 11 (8): 676-682, 2012. <https://doi.org/10.3923/pjn.2012.774.780>
- Guillamón, E.; Rodríguez, J.; Burbano, C.; Muzquiz, M.; Pedrosa, M.; Cabanillas, B.; Crespo, J.; Sancho, A.; Mills, E.; Cuadrado, C. 2010. Characterization of lupin major allergens (*Lupinus albus* L.). *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, 1668–1676. DOI: 10.1002/mnfr.200900452
- Hefle, S.; Lemanske, R.; Bush, R. 1994. Adverse reaction to lupine-fortified pasta. *J Allergy Clin Immunol*, 94:167- 72, august 1994.
- Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2010). Tocols stability during bread, water biscuit and pasta processing from wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 52, 254-259. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.06.002>
- Huang, H.; Hsu, Ch.; Yang, B.; Wang, Ch. 2013. “Potential utility of High-Pressure Processing to address the risk of food allergen concerns” En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 13, 2014. DOI: 10.11/1541-4337.12045
- Jacobsen, E. and Mujica, A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz 2006 458-482. <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2028.pdf>.

- Jiménez-Martínez, C.; Hernández-Sánchez, H.; Álvarez-Manilla, G.; Robledo-Quintos, N.; Martínez-Herrera, J.; Dávila-Ortiz, G. (2001). Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid, and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(4), 421-428.
- Karamać, M.; Orak, H.; Amarowicz, R.; Orak, A.; Piekoszewski, W. (2018). Phenolic contents and antioxidant capacities of wild and cultivated White lupin (*Lupinus albus* L.) seeds. *Food Chemistry* 258 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.041>
- Keeler, R.; Cronin, E.; and Shupe J. 1976. Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. IV – Concentration of total alkaloids, and the teratogen anagyrine as a function of plant part and stage of growth and their relationship to crooked calf disease. *Journal of Toxicology Environmental and Health* (1): 899-908. http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/966319/Lupin_alkaloids_from_teratogenic_and_nonteratogenic_lupins_IV_Concentration_of_total_alkaloids_in_dividual_major_alkaloids_and_the_teratogen_anagyrine_as_a_function_of_plant_part_and_stage_of_growth_and_their_relationship_to_crooked_calf_disease_
- Khan, M.; Karnpanit, W.; Nasar-Abbas, S.; Huma, Z.; Jayasena, V. (2015). Phytochemical composition and bioactivities of lupin: a review. *International Journal of Food Science and Technology* 2015, 50, 2004-2012. DOI: 10.1111/ifjs. 12796.
- Krol, A.; Amarowicz, R.; Weidner, S. 2018. Content of Phenolic Compounds and Antioxidant Properties in Seeds of Sweet and Bitter Cultivars of Lupine (*Lupinus angustifolius*). *Natural Products Communications* Vol. 13 (10) 2018:1341-1344. <http://www.naturalproducts.us>
- Kuskoski, E.; Asuero, E.; Troncoso, A.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4): 726-732.

- Laemmli, U. 1970. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970). <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lampart-Szczapa, E.; Korczak, J.; Nogala-Kalucka, M.; Zawirska-Wojtasiak, R. 2003. Antioxidante properties of lupin seed products. *Food Chemistry* 83 (2003) 279-285. DOI:10.1016/S0308-8146(03)00091-8.
- Loganayaki, N.; Rajendrakumaran, D.; Manian, S. 2010. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Different Solvent Extracts from Banana (*Musa paradisiaca*) and Mustai (*Rivea hypocrateriformis*). *Food Sci. Biotechnol.* 19(5):1251-1258 (2010). DOI 10.1007/s10068-010-0179-7.
- Magni, Ch.; Sessaa, F.; Accardo, E.; Vanoni, M.; Morazzoni, P.; Scarafoni, A.; Duranti, M. 2004. Conglutin g, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15 (2004) 646 – 650. DOI:10.1016/j.jnutbio.2004.06.009
- Mahattanatawee, K.; Manthey, J.; Luzio, G.; Talcott, S.; Goodner, K.; Baldwin, E. 2006. Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 54, N°. 19.
- Manrique, G. 2015. Revalorización del Perfil Nutricional de las Legumbres. I Jornada de Revalorización de las Legumbres Secas para la Alimentación Humana. Bolsa de Cereales. CABA. Argentina. <https://iyp2016.org/resources/technical-reports/argentina/97-nutrient-pulses-guillermo-manrique-dec2015/file>
- Martín, J. 2017. Utilización del altramuz en la alimentación del ganado. *Revista de Extensión Agraria.* p 81-84. En: www.magrama.gob.es/ministerio/pags/.../REA_1983_03_81_84.pdf.
- Mazumder, K.; Biswas, B.; Kerr, P.; Blanchard, Ch.; Nabila, A.; Golder, M.; Aziz, M.; Farahnaky, A. 2021. Comparative assessment of nutritional, thermal, rheological, and functional properties of nine Australian lupin cultivars. *Scientific Reports* (2021) 11:21515. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00838-x>.

- Mera, M. 2016. Especies de lupino y su utilización [en línea]. Temuco: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 326. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6508> (Consultado: 24 abril 2023).
- Miano, A. y Duarte, A. 2018. The Hydration of Grains: A Critical Review from Description of Phenomena to Process Improvements. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 17. Institute of Food Technologists. Doi: 10.1111/1541-4337.12328.
- Miyazawa, T.; Nakagawa, K.; Sookwong, P. (2011) “Health benefits of vitamin E in grains, cereals and green vegetables”, *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), pp. 651-654 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.0>
- Moo-Huchin, V.; Moo-Huchin, M.; Estrada-León, R.; Cuevas-Glory, L.; Estrada-Mota, I.; Ortiz-Vázquez, E.; Betancur-Ancona, D; Sauri-Duch, E. 2015. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.127>
- Multari, S.; Marsol-Vall, A.; Yang, B.; Suomela, J. 2018. Effects of Aromatic Herb Flavoring on Carotenoids and Volatile Compounds in Edible Oil from Blue Sweet Lupin (*Lupinus angustifolius*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2018, 120, 1800227. DOI: 10.1002/ejlt.201800227.
- Muñoz, E.; Luna-Vital, D.; Fornasini, M.; Baldeón, M.; Gonzalez de Mejía, E. 2018. Gamma-conglutin peptides from Andean lupin legume (*Lupinus mutabilis* Sweet) enhanced glucose uptake and reduced glucogenesis in vitro. *Journal of Functional Foods* 45 (2018) 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.021>.
- Muranyi, I. 2016. Properties of protein isolates from lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as affected by the isolation method. Tesis para optar el Grado de Doctor. Technische Universität München. Alemania. <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1341587/1341587.pdf>

- Muranyi, I.; Volke, D.; Hoffman, R.; Eisner, P.; Herfellner, T.; Brunnbauer, M.; Koehler, U.; Schweiggert-Weisz. 2016. Protein distribution in lupin protein isolates from *Lupinus angustifolius* L. prepared by various isolation techniques. Food Chemistry 207 (2016) 6-15. P. 12. (En Capítulo 2, pg 51 de Muranyi (2016). “Properties of protein isolates from lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as affected by the isolation method”. Technische Universität München).
- Muranyi, I.; Volke, D.; Hoffman, R.; Eisner, P.; Herfellner, T.; Brunnbauer, M.; Koehler, P.; Schweiggert-Weisz. 2016. Protein distribution in lupin protein isolates from *Lupinus angustifolius* L. prepared by various isolation techniques. Food Chemistry 207 (2016) 6-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.073>
- Nadal, P.; Canela, N.; Katakis, I and Sullivan, C. 2011. Extraction, Isolation, and Characterization of Globulin Proteins from *Lupinus albus*. J. Agric. Food Chem.2011, 59, 2752-2758
- Neves, J.; Talhinhas, P.; Bruno de Sousa, R. 2016. Yield and seed Chemical composition of *Lupinus mutabilis* in Portugal. Sociedade de Ciencias Agrarias de Portugal. <http://dx.Doi.org/10.19084/RCA16079>.
- Ortega-David, E.; Rodriguez, A.; David, A. and Zamora-Burbano A. 2010. Caracterización de semillas de *Lupinus mutabilis* sembrado en los andes de Colombia. Acta agronómica 59: 111-118. <http://www.bdigital.unal.edu.co/18305/2/14094-42145-1-PB.pdf>
- Peeters, K.; Nordlee, J.; Penninks, A.; Chen, L.; Goodman, R.; Bruijnzeel-Koomen, C.; Hefle, S.; Taylor, S.; Knulst, A. 2007. Lupine allergy: Not simply cross-reactivity with peanut or soy. J. Allergy Clin. Immunol. September 2007: 647-653.
- Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. (2001). Antioxidantes de los Alimentos. Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. España.
- Prusinski, J. 2017. White Lupin (*Lupinus albus* L.) – Nutritional and Health Values in Human Nutrition – a Review. Czech J. Food Sci., 35: 95-105. Doi: 10.17221/114/2016-CJFS.

- Przymusinski, R.; Rucinska, R.; Gwózd, E. 2004. Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany* 52: 53–61. www.elsevier.com/locate/envexbot. Consultado el 27.02.2017.
- Quispe, D. 2015. “Composición nutricional de diez genotipos de lupino (*L. mutabilis* y *L. albus*) desamargados por proceso acuoso” Tesis para optar el Grado de Magister Scientiae en Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú.
- Radauer and Breiteneder, 2007. “Evolutionary biology of plant food allergens”. *J. Allergy Clin. Immunol.* Vol 120, N| 3: 518-525
- Rawson, A.; Patras, A.; Dave, B.; Oomah, O.; Campos-Vega, R.; Hossains, M. 2014. “Antioxidant Activity of Phytochemicals and Their Method of Analysis” In *Advances in Food Science and Nutrition*, (153–256) 2014 c Scrivener Publishing LLC.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 1231-1237.
- Repo-Carrasco-Valencia, R. 2014. Valor Nutricional y Compuestos Bioactivos en los Cultivos Andinos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Fondo editorial UNALM. Lima. Perú.
- Sánchez, C. 1996. Efectos de la elaboración sobre los polisacáridos de la pared celular de la aceituna, y su relación con la textura. Tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia. Universidad de Sevilla. España.
- Schoeneberger, H.; Gross, R.; Cremer, H.; Elmadfa, I. 1982. Composition and Protein Quality of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Nutrition* – February 1982. DOI:10.1093/jn/112.1.70

- Shahidi, F. y Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity, *Journal of Functional Foods*, 18(B), 757-781. DOI: 10.1016/j.jff.2015.01.047.
- Suca, G. y Suca, C. 2015. Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) como futura fuente proteínica y avances de su desarrollo agroindustrial. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 18(2), 55–71. Recuperado a partir de <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/11791>.
- Swisscontact (sf). Promoviendo la herencia de nuestros ancestros: Producción resiliente, comercialización y consumo de tarwi. Estudio Sistémico. Perú. https://www.swisscontact.org/_Resources/Persistent/c/a/3/2/ca3214faf722c23f6e5eb92952b624b90f07e075/ESTUDIO%20SISTEMICO%20PERU.pdf
- Vásquez, V.; Salhuana, J.; Alvarado, M.; Ludeña, A.; Jiménez, L. 2019. Empleo de tres métodos de desamargado a través de la evaluación sensorial de harina y pan de *Lupinus mutabilis* Sweet. *Agroind. sci.* 9(1): 53 - 59 (2019).
- Villacrés, E.; Allauca, V.; Peralta, E.; Insuasti, G.; Álvarez, J.; Quelal, M. 2015. Germination, an Affective Process to Increase the Nutritional Value and Reduce Non-Nutritive Factors of Lupine Grain (*Lupinus mutabilis* Sweet). *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering* 2015, 5(4): 163-168. DOI: 10.5923/j.food.20150504.01.
- Villacrés, E.; Álvarez, J.; Rosell, C. (2020a). Effects of two debittering processes on the 517-alkaloid content and quality characteristics of lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100,2166-2175. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10240>.
- Villacrés, E.; Quelal, M.; Fernández, E.; García, G.; Cueva, G.; Rosell, C. (2020b). Impact of debittering and fermentation processes on the antinutritional and antioxidant compounds in *Lupinus mutabilis* Sweet. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109745>

- Villacrés, E.; Rubio, A.; Egas, L.; Segovia, G. 2006. Usos Alternativos del Chocho. INIAP-FUNDACYT. Boletín Divulgativo N° 333. Proyecto PFN-03-060. Quito. Ecuador.
- Villalpando, F.; Medina, L.; Rodríguez, S.; Ventura, C. 2019. Esparteína y Lupanina como fitoterapias anticonvulsivas alternativas. e-CUCBA / enero-junio/año 6/ 2019/ número 11/ 8-17. DOI: <https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i11.124>
- Vollmannova, A.; Lidikova, J.; Musilova, J.; Snirc, M.; Bojnanska, T.; Urminska, D.; Tirdilova, I.; Zetochova, E. 2021. White Lupin as a Promising Source of Antioxidant Phenolics for Functional Food Production. Journal of Food Quality. Volume 2021, Article ID 5512236, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2021/5512236>
- Yilmaz, V. A., Brandolini, A., & Hidalgo, A. (2015). Phenolic acids and antioxidant activity of wild, feral and domesticated wheats. Journal of Cereal Science, 64, 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.05.005>
- Yorgancilar, M. y Bilgicli, N. 2014. Chemical and nutritional changes in bitter and sweet lupin seeds (*Lupinus albus*) during bulgur production. J Food Sci Technol 51:1384-1389. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0640-0>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Método de Bradford para la determinación de la proteína soluble

El ensayo de unión al colorante de Bradford es un ensayo colorimétrico para medir la concentración total de proteínas en función del cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diversas concentraciones de proteínas: el colorante se une a aminoácidos principalmente básicos (especialmente arginina) y aromáticos residuos.

Preparación del reactivo de Bradford

1. Se disolvió 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%, se agregó 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v).
2. Una vez que el tinte disolvió completamente, se diluyó a 1 litro con agua desionizada.
3. Se filtró a través del papel Whatman # 1 justo antes de usarlo.

Preparación de los estándares

Se preparó un conjunto de estándares a partir de un stock de proteínas cuya concentración es conocida. Los valores de Bradford obtenidos para el estándar se usaron luego para construir una curva estándar con la que se pueden comparar los valores desconocidos obtenidos para determinar su concentración. Se utilizó BSA ((Bovine Serum Albumin) a una concentración de 1 mg/ml en solución tampón (Tris-Hcl 50 mM, pH 9.00, + 0.5 M NaCl) para construir la curva. La concentración precisa de proteína en la solución estándar debe determinarse a partir de su absorbancia a 280 nm: la absorbancia de una solución de 1 mg / ml de albúmina de suero bovino, en una trayectoria de luz de 1 cm es de **0,66**.

Medición de los estándares de proteína

1. Se calentó el espectrofotómetro.
2. Se pipeteó seis volúmenes diferentes [0 μ l (blanco), 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ , 10 μ l] de 1 mg / ml de BSA en cubetas separadas.
3. La cubeta sin proteína estándar sirve como un blanco.
4. Se agregó 1,0 ml de reactivo de Bradford a cada cubeta y mezcló invirtiendo suavemente.
5. Se dejó las cubetas a temperatura ambiente durante 10 minutos.
6. Se midió la absorbancia de cada cubeta a 595 nm.

Generación de la curva estándar

1. Se elaboró un diagrama de dispersión para los valores de curva estándar: El eje X para los microgramos (μ g) de proteína estándar que se analizaron; El eje Y para los valores de Absorbancia a 595 nm que fueron medidos.
2. Se ajustó una línea de tendencia lineal al gráfico, obteniéndose la ecuación de regresión lineal.

Extracción de la proteína soluble de las muestras de lupino para su cuantificación por Bradford

250 mg de harina de semilla de lupino (18 muestras desengrasadas; 3 muestras no desengrasadas) se suspendieron en 5 ml (1:20) de Tris-HCl 50 mM, pH 9.00 y solución de tampón NaCl 0.5 M , luego se agita durante la noche a 4 ° C. La suspensión se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos, se colectó el sobrenadante (sobrenadante 1); luego, el residuo se extrajo de nuevo durante 3 horas a 4 ° C como se describe anteriormente usando 2 ml de solución tampón, obteniéndose el sobrenadante 2. Finalmente se juntaron los sobrenadantes (extracto total) y se procedió a la determinación de la proteína soluble de este extracto (250 mg de harina en 7 ml de buffer).

Cuantificación de la proteína soluble de las muestras de lupino amargo desengrasado por Bradford

Los extractos para la determinación de la proteína soluble mediante Bradford se obtuvieron siguiendo el procedimiento de la “extracción 2”

- Se tomó, por duplicado, 10 μ L del extracto y se diluyó con 100 μ L buffer (dilución 1 en 10).

- De la dilución anterior se tomó 5 μL y se le agregó 95 μL de solución de azul de comassie.
- Se dejó reposar por 5 minutos y se leyó la Absorbancia o Densidad Óptica a 595 nm. contra un Blanco de azul de comassie.
- Se determinó la concentración de las muestras en base a la ecuación obtenida de la Curva Estándar.

Anexo 2: Protocolo para los ensayos de electroforesis en gel (PAGE-SDS)

1. Preparación del gel separador:

- Se colocan los bastidores de las placas (se sujetan las dos placas de vidrio en los bastidores de placas) en los soportes de los bastidores.
- Se prepara la solución de gel (como se describe anteriormente) en un vaso pequeño separado.
- Se agitar la solución suavemente pero totalmente.
- Se pipetea la cantidad adecuada de solución de gel de separación en el espacio entre las placas de vidrio.
- Para que la parte superior del gel de separación sea horizontal, se rellena el agua en el espacio hasta que se desborde.
- Se espera 20-30min para que se polimerice (gel).

2. Preparación del gel de apilamiento

- Se desecha el agua del gel separador, el cual se podrá ver a la izquierda.
- Se pipetea en gel de apilamiento hasta rebosar.
- Se inserte el peine bien formado sin atrapar aire debajo de los dientes. Se espera 20-30min para que se solidifique.

3. Preparación de las muestras:

- Se mezcla las muestras con el tampón de muestra (buffer de carga).
- Se calientan en agua hirviendo durante 5-10 min.

4. Ejecución de la corrida aplicando voltaje

- Asegurarse de la polimerización completa del gel de apilamiento y sacar el peine.
- Sacar las placas de vidrio del marco y colocarlas en la tanque o recipiente del buffer.
- Verter el tampón de corrida (tampón de electroforesis) en la cámara interior y seguir vertiendo hasta el desbordamiento y que la superficie del tampón alcance el nivel requerido en la cámara exterior.
- Cargar las muestras preparadas en los pozos y asegurarse de no desbordar. No olvidar de cargar marcador de proteínas.
- Luego cubrir la parte superior y conectar los ánodos.
- Establecer el voltaje apropiado y ejecutar la corrida.

- En cuanto al tiempo total de funcionamiento, detener SDS-PAGE cuando el indicador más bajo de la proteína casi alcance la línea de los pies de la placa de vidrio.

5. Tinción con Azul de Coomassie

Una vez realizado el recorrido electroforético, el gel se introduce durante al menos tres horas en una solución que tiene dos funciones: fijar las proteínas, para evitar que difundan en el gel, y colorear las bandas de proteínas para que sean visibles. La solución contiene 0,05 % (p/v) de coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad), el colorante que se une específicamente sólo a las proteínas y no al gel, es disuelto en una solución de 30% (v/v) de etil alcohol, 0,1% (p/v) de sulfato de cobre, 10% (v/v) de ácido acético y 60% de agua durante al menos 3 horas.

6. Decoloración del gel

La decoloración tiene lugar a continuación con etanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua 60% (v/v) durante al menos 120 minutos, siempre bajo agitación.

Anexo 3: Protocolo para la extracción de los carotenoides y los tocoles

1. Procedimiento

- a. Pesar 2 g de harina en tubos con tapón de rosca
- b. Saponificar bajo nitrógeno (gas) por 45 min. a 70 °C después de adición de 5 ml de pirogalol etanólico (60 g/L) como antioxidante, 2 ml de etanol (95%), 2 ml de cloruro de sodio (10 g/L) y 2 ml de hidróxido de potasio (600 g/L).
- c. Durante la saponificación agitar los tubos con vortex cada 5-10 min.
- d. Enfriar en baño de hielo
- e. Añadir 15 ml de cloruro de sodio (10 g/L)
- f. Extraer 2 veces con 15 ml de mezcla hexano:acetato de etilo (9:1 v/v)
- g. Colectar la capa orgánica y evaporar bajo vacío
- h. Secar con nitrógeno
- i. Disolver el residuo en 2 ml de mezcla hexano:alcohol isopropílico (90:10 v/v)
- j. Filtrar a través de membrana de PTFE de 0.22 µM.
- k. Inyectar 20 µL de la solución en el sistema HPLC en fase normal.

2. Reactivos

- Nitrógeno (gas)
- Pirogalol etanólico (60 g/L)
- Etanol (95%)
- Cloruro de sodio (10 g/L)
- Hidróxido de potasio (600 g/L).
- Hexano:acetato de etilo (9:1 v/v)
- Mezcla hexano:alcohol isopropílico (90:10 v/v)

3. Equipos y Materiales

- Balanza analítica
- Espátula
- Tubos con tapón de rosca
- 4 pipetas de 5 ml
- Pipeta de 20 ml
- Bombilla de aspiración
- Vortex

- Baño de hielo
- Probeta graduada de 20 ml
- Pera de decantación
- Balón para evaporar al vacío
- Evaporador al vacío
- Membrana de PTFE de 0.22 μM
- Microjeringa

Anexo 4: Protocolos para la determinación de la capacidad antioxidante

Preparación de la muestra

Se pesó 0,1 g de harina de lupino y se sometió a triple extracción con 1 mL de hexano. Tras agitarlas primero con Vortex durante unos 30 s y luego con un agitador orbital durante 20 min a 4 °C, se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min a 8 °C. Los sobrenadantes recuperados de las tres extracciones se mezclaron en un único tubo (fracción hidrófoba, que contiene tocoles y carotenoides). Para la extracción de la fracción hidrófila, que contiene los compuestos fenólicos, se extrajo el sedimento siguiendo el mismo procedimiento, pero utilizando metanol (CH₄OH) al 80% (v/v). Todas las operaciones se realizaron al abrigo de la luz.

1. Método PR (Poder Reductor)

a) Procedimiento:

De acuerdo al procedimiento seguido por Oyaizu (1986).

- Preparación de muestras
 - Pesar 0,1 g de harina de lupino y extraer por triplicado con 1 ml de hexano. Agitar primero con Vortex durante unos 30 s y luego con agitador orbital durante 20 min a 4°C.
 - Centrifugar a 12000 rpm durante 10 min a 8 °C. Los sobrenadantes recuperados de las tres extracciones se combinan en un solo tubo (fracción hidrofóbica, que contenía tocoles y carotenoides).
 - Para la extracción de la fracción hidrófila, que contiene los compuestos fenólicos, el sedimento se somete a extracción siguiendo el mismo procedimiento utilizando metanol (CH₄OH) al 80% (v/v). Todas las operaciones se llevan a cabo lejos de la luz.

- Determinación del poder reductor

El análisis de la capacidad antioxidante utilizando el método de poder reductor se realizó según lo informado por Loganayaki et al. (2011), con algunas modificaciones. Este análisis se basa en el principio de que las sustancias que tienen un potencial de reducción reaccionan con el ferrocianuro de potasio (Fe³⁺) para formar ferricianuro de potasio (Fe²⁺). Este último reacciona con el cloruro férrico para formar el complejo férrico-ferroso que tiene una absorbancia máxima a 700 nm (Bhalodia et al., 2013).

- A 1 mL de ferrocianuro de potasio añadir en el siguiente orden: 1 mL de tampón de fosfato a pH 6,6, 0,85 mL de agua desionizada y 0,15 mL de extracto.
- Revolver la mezcla durante unos segundos utilizando el agitador de vórtice Mn1Minishaker (IKa, Alemania) e incubar en un baño termostato a 50 ° C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar, luego agregar 1 ml de TCA al 10% y revolver la mezcla nuevamente.
- Agregar 0.3 mL de FeCl₃ (0.08g en 50 mL) y agitar en vórtex.
- Medir la absorbancia a 700 nm en cubetas de con una trayectoria óptica de 1 cm. Realizar la puesta a cero del instrumento con agua desionizada.

b) Reactivos:

- Hexano.
- Metanol (CH₄OH) al 80% (v/v)
- Ferrocianuro de potasio
- Tampón de fosfato a pH 6,6
- agua desionizada
- Ácido tricloroacético (TCA) al 10%
- Tricloruro de hierro FeCl₃

c) Equipos y Materiales:

- Espectrofotómetro de doble haz (modelo V650 Jasco, Japón)
- Agitador de vórtice Mn1Minishaker (IKa, Alemania)
- Centrífuga (8°C)
- Agitador orbital
- Baño termostato (EN.CO DC30 Haake) a 50 ° C
- Cubetas de plástico con una trayectoria óptica de 1 cm.

2. Método ABTS

Siguiendo el procedimiento reportado por Re et al. (1999)

a) Procedimiento:

La prueba ABTS para medir la actividad antioxidante se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Re et al. (1999). Esta prueba consiste en la decoloración del compuesto

coloreado (ABTS+) que en presencia de antioxidantes registra una reducción de la absorbancia a 734 nm, tras la donación de un átomo de hidrógeno por parte de estos compuestos al catión radical.

- Añadir 150 µL de la muestra extraída a 5 ml de la solución radical; esperar durante 6 minutos a 30 °C en un baño termostato para que se lleve a cabo la reacción.
- Medir la absorbancia a 734 nm utilizando cubetas con una trayectoria óptica de 1 cm. Realizar la puesta a cero del instrumento con etanol.
- La actividad antioxidante se evalúa como un porcentaje de disminución de la absorbancia, también llamado "porcentaje de inhibición" calculado según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición Abs734 nm} = [(1 - \text{Absc}) / (\text{Absb})] \times 100$$

Absb = Absorbancia del blanco

Absc = Absorbancia de la muestra después de la reacción

b) Reactivos:

- Reactivo ABTS+
- Etanol

c) Equipos y Materiales:

- Espectrofotómetro de doble haz (modelo V650 Jasco, Japón)
- Baño termostato 30 °C (EN.CO DC30 Haake)
- Cubetas de plástico con una trayectoria óptica de 1 cm

3. Método FRAP

Según procedimientos descritos por Yilmaz et al. (2015).

a) Procedimiento:

El análisis de la actividad antioxidante por el método FRAP se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento reportado por Siebenhandl et al. (2007) ligeramente modificado. La prueba se basa en la reducción a pH bajo del complejo férrico Fe³⁺-TPTZ a la forma ferrosa (que tiene un color azul intenso). La actividad antioxidante se estima registrando un aumento de la densidad óptica debido a la formación de iones ferrosos (Fe²⁺) a partir de un reactivo

específico, FRAP que contiene TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-triazina) y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y en presencia de compuestos antioxidantes.

- Agregar 200 μL de la muestra extraída a 4,5 ml del reactivo FRAP; esperar durante 60 minutos a 37 °C en un baño termostato para que se lleve a cabo la reacción.
- Medir la absorbancia a 593 nm en cubetas con una trayectoria óptica de 1 cm. El instrumento se restablece con tampón de acetato 0.3 M pH 3.6.
- La actividad antioxidante se calcula primero restando del valor de absorbancia del complejo formado con la muestra (Absc), el del blanco (Absb) obtenido sometiendo a análisis 200 μL de tampón de acetato 0,3 M pH 3,6 en lugar de la muestra y, posteriormente, comparando los resultados con los de la curva de calibración de Trolox.
- Para la construcción de la curva de Trolox utilizar 18 diluciones del estándar Trolox de 0,06 a 0,90 mM. Verificar cada día de análisis la curva utilizando seis diluciones.
- La actividad antioxidante se expresa como milimoles de equivalentes de Trolox (TE) por kilogramo de harina integral sobre materia seca (ss). El análisis se realiza por duplicado.

$$\text{Absorbancia (FRAP reducido)} = \text{Absc} - \text{Absb}$$

b) Reactivos:

- Reactivo FRAP
- Tampón de acetato 0.3 M pH 3.6.
- Reactivo Trolox

c) Equipos y Materiales:

- Baño termostato (MR Hei-Standard Heidolph, Alemania)
- Espectrofotómetro de doble haz
- Cubetas de plástico con una trayectoria óptica de 1 cm

4. Método DPPH

Según procedimiento descrito por Yilmaz et al. (2015).

a) Procedimiento:

El análisis de la actividad antioxidante utilizando el método DPPH se realizará según lo informado por Lavelli et al. (2008). La actividad antioxidante se evalúa como la capacidad

de inactivar radicales libres mediante extractos utilizando el radical estable 1,1-difenil-2-picrilidrazida DPPH (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

- Añadir 1 ml de los extractos a 2 ml de DPPH en metanol ($6,35 \times 10^{-5}$ M).
- Después de 30 min a 25 °C se alcanza la absorbancia máxima, que corresponde al porcentaje residual de DPPH.
- La medición de la reducción de radicales por antioxidantes se lleva a cabo a 517 nm. Se analizarán cuatro o más diluciones para cada muestra; luego se calculará la pendiente de la línea de regresión para determinar la cantidad de harina necesaria para inactivar el 50% del radical DPPH (I50). Paralelamente, también se calculará una línea de regresión para el antioxidante de referencia Trolox (entre 0 y 50 mM).
- La actividad antioxidante se expresa como la relación entre el I50 del Trolox y el I50 de la muestra, es decir, milimoles de equivalentes de Trolox (TE) por kilogramo de harina integral, a base seca (s.s.). El análisis se realizará por duplicado.

b) Reactivos:

- Reactivo de DPPH en metanol ($6,35 \times 10^{-5}$ M)
- Trolox

c) Equipos y Materiales:

- Espectrofotómetro Beckman DU-62.
- Cubetas de plástico con una trayectoria óptica de 1 cm

Anexo 5: Parámetros de color L*, a*, b* de las harinas de los 20 ecotipos de tarwi

Ecotipo	L*	a*	b*
Altagracia	83.6	-2.6	28.2
Andenes 80	82.0	-2.0	27.1
Andenes INIA	81.9	-2.0	27.6
Cajamarca	83.4	-2.7	26.3
Cholo fuerte	82.8	-2.2	26.5
Compuesto blanco semiprecoz	81.8	-3.0	33.3
H6 INIA BN	81.9	-2.2	28.2
H6 INIA BP	83.0	-2.2	25.8
Huallanca	86.0	-2.5	22.0
Huanuco 1	83.1	-2.9	28.1
Huanuco 2	79.1	-2.5	31.1
Lircay	83.1	-2.2	27.2
Moteado beige	84.4	-2.4	26.3
Pallasca	83.0	-3.2	30.1
Paton grande	83.8	-2.9	27.3
Puno 2 Blanquita	82.4	-3.2	31.0
Yanamuclo 008-1	84.1	-2.5	25.6
Yanamuclo 008-3	87.5	-3.2	22.1
Yanamuclo PLGO	84.5	-2.2	26.2
Yunguyo	82.7	-2.5	28.0
Promedio	81.2	-2.1	23.0
Controles			
<i>L. albus</i> – Ares	81.1	0.7	21.5
<i>L. albus</i> – Multitalia	84.5	-1.7	23.5
<i>L. angustifolius</i> - Boregine	79.5	-0.8	25.4
<i>L. luteus</i> – Percoz	85.0	-1.1	18.9

Anexo 6: Resultados del análisis de varianza

ANVA: Humedad

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	24	179.51	7.479	64.97	<2e-16 ***
Residuals	25	2.88	0.115		

ANVA: Proteína

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	24	179.51	7.479	64.97	<2e-16 ***
Residuals	25	2.88	0.115		

ANVA: Grasa

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Nome	24	581.4	24.225	431	<2e-16 ***
Residuals	25	1.4	0.056		

ANVA: Ceniza

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Nome	24	12.684	0.5285	130.8	<2e-16 ***
Residuals	25	0.101	0.0040		

ANVA: RP

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	24	83.15	3.464	12.41	1.05e-08 ***
Residuals	25	6.98	0.279		

ANVA: ABTS-M

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	24	17092	712.2	121	<2e-16 ***
Residuals	25	147	5.9		

ANVA: ABTS-H

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	24	172.18	7.174	3.881	0.000633 ***
Residuals	25	46.21	1.848		

ANVA: DPPH-M

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	24	99.16	4.132	34.19	1.04e-13 ***
Residuals	25	3.02	0.121		

ANVA: DPPH-H

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	24	179.51	7.479	64.97	<2e-16 ***
Residuals	25	2.88	0.115		

Si P valor es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis planteada (las medias o promedios son iguales)