

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE DIEZ GENOTIPOS DE
LUPINO (*L. mutabilis* y *L. albus*) DESAMARGADOS POR
PROCESO ACUOSO”**

Presentada por:

DAVID QUISPE SANCA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima - Perú

2015

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mi familia toda: mi madre Amelia, mi padre José, mis hermanos Alcides, Bill, Ruth y Abraham quienes son la inspiración y fortaleza para lograr todos los objetivos trazados.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por el financiamiento de la presente tesis, dentro del marco de Proyecto Lupino “Estudio de la diversidad genética de diez ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*), con alto potencial productivo e industrial en el Perú”.

Al Programa de Leguminosas de Grano y Oleaginosas (PLGO) de la Universidad Nacional Agraria la Molina quien recolectó y proporcionó todos los genotipos para el presente estudio. A la Ing. Elvia Mostacero y la Ing. Amelia Huaranga quienes estuvieron al pendiente en el seguimiento de la presente investigación.

Agradezco al Dr. Félix Camarena Mayta quien me permitió formar parte del equipo del proyecto lupino de CONCYTEC y a la Dra. Patricia Glorio Paulet por el patrocinio del presente trabajo de investigación.

A la Dra. Ritva Repo de Carrasco y al Ing. Mg.Sci. Carlos Elías Peñafiel quienes permitieron una mejora del trabajo debido a las revisiones realizadas

Agradezco a grandes amigos técnicos de laboratorio (Sra. Julia, Carelia, Zahara, Juan, y Sr. Max), quienes permitieron el acceso a los ambientes, materiales y equipos para el desarrollo de los análisis respectivos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	01
II. REVISIÓN DE LITERATURA	03
2.1 Antecedentes históricos	03
2.2 Situación actual	05
2.3 Lupino	06
2.4 Composición proximal	07
2.4.1 Proteína	07
2.4.2 Extracto etéreo	10
2.4.3 Fibra cruda	12
2.4.4 Carbohidratos	13
2.4.5 Cenizas	15
2.5 Actividad antioxidante	16
2.6 Factores anti nutricionales	18
2.6.1 Oligosacáridos	19
2.6.2 Alcaloides totales	20
2.7 Desamargado de lupino	22
2.7.1 Remojo	23
2.7.2 Cocción	25
2.7.3 Lavado	25
2.8 Efecto del proceso de desamargado sobre nutrientes y factores	

antinutricionales del lupino	26
2.9 Métodos de análisis por espectrofotometría	30
2.9.1 Actividad antioxidante por DPPH	31
2.9.2 Proteína soluble por Bradford	32
2.9.3 Carbohidratos totales y oligosacáridos por Fenol Ácido Sulfúrico	33
2.9.4 Alcaloides totales por Púrpura Bromocresol	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 Lugar de ejecución	35
3.2 Materiales y equipos	35
3.2.1 Materia prima	35
3.2.2 Reactivos	35
3.2.3 Materiales	37
3.2.4 Equipos	37
3.3 Métodos de Análisis	38
3.3.1 Humedad	38
3.3.2 Carbohidratos por diferencia	38
3.3.3 Proteína cruda	38
3.3.4 Extracto etéreo	38
3.3.5 Cenizas	38
3.3.6 Fibra cruda	39
3.3.7 Materia seca	39
3.3.8 Rendimiento en grano seco	39
3.3.9 Costo de desamargado de lupino	40
3.3.10 Actividad antioxidante	40
3.3.11 Proteína soluble	40
3.3.12 Carbohidratos totales y oligosacáridos	40
3.3.13 Alcaloides totales	40
3.3.14 Valor energético	41
3.3.15 Análisis estadístico	41
3.4 Metodología experimental	42
3.4.1 Materia prima	42
3.4.2 Proceso de desamargado	42

3.4.3	Evaluación	45
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
4.1	Variación de peso de grano húmedo	46
4.2	Disminución de materia seca	47
4.3	Rendimiento de grano seco desamargado	49
4.4	Costo de desamargado de lupino	50
4.5	Cambios en los componentes de valor nutricional	50
4.5.1	Proteína	50
4.5.1.1	Proteína cruda	50
4.5.1.2	Proteína soluble	53
4.5.2	Carbohidratos	55
4.5.2.1	Carbohidratos por diferencia (CDF)	55
4.5.2.2	Carbohidratos por espectrofotometría (CSP)	57
4.5.3	Fibra cruda	58
4.5.4	Extracto etéreo	61
4.5.5	Cenizas	63
4.6	Cambios en el contenido de actividad antioxidante	66
4.7	Reducción de factores anti nutricionales	69
4.7.1	Oligosacáridos	69
4.7.2	Alcaloides totales	71
4.8	Variación de valor energético	73
V.	CONCLUSIONES	76
VI.	RECOMENDACIONES	78
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
VIII.	ANEXOS	102

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 01: Características taxonómicas y fisiológicas del lupino	07
Cuadro 02: Contenido de proteína de diferentes especies de lupinos y leguminosas	08
Cuadro 03: Contenido de extracto etéreo de diferentes especies de lupino y otras leguminosas	11
Cuadro 04: Contenido de ácidos grasos de diferentes especies de lupino y otras leguminosas	11
Cuadro 05: Contenido de fibra cruda de diferentes especies de lupino y otras leguminosas	12
Cuadro 06: Contenido de carbohidratos de diferentes especies de lupino y otras leguminosas	14
Cuadro 07: Contenido de cenizas de diferentes especies de lupino y la soja	15
Cuadro 08: Contenido de minerales del tarwi, soja y algunas leguminosas	16
Cuadro 09: Actividad antioxidante de lupino	17
Cuadro 10: Contenido antioxidante de diferentes productos alimenticios	18
Cuadro 11: Contenido de oligosacáridos de diferentes especies de lupino y algunas leguminosas	19
Cuadro 12: Contenido de alcaloides de diferentes especies de lupino	21
Cuadro 13: Comparación de algunos métodos de desamargado de lupino	24
Cuadro 14: Variación de peso húmedo de diez genotipos de lupino durante las etapas de desamargado (remojo, cocción y lavado)	46
Cuadro 15: Rendimiento en grano seco de diez genotipo de lupino desamargado	49
Cuadro 16: Costo de uso de agua y gas para desamargar lupino	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 01:	Esquema de complejo proteína-colorante Bradford	32
Figura 02:	Genotipos de lupino (<i>L. mutabilis</i> y <i>L. albus</i>) para estudio de desamargado	36
Figura 03:	Esquema experimental del efecto de desamargado sobre la composición nutricional de diez genotipos de lupino	43
Figura 04:	Proceso de obtención de harina de lupino desamargada	44
Figura 05:	Materia seca de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado	48
Figura 06:	Proteína cruda y proteína soluble de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado	51
Figura 07:	Carbohidratos de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado	56
Figura 08:	Fibra cruda de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado	60
Figura 09:	Extracto etéreo de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado	62
Figura 10:	Cenizas diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado	64
Figura 11:	Contenido antioxidante de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado	67
Figura 12:	Oligosacáridos de lupino crudo y desamargado determinado por espectrofotometría	70
Figura 13:	Alcaloides totales de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado.	72
Figura 14:	Valor energético de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado	74

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 01: Procedimientos de desamargado de lupino	103
Anexo 02: Procedimientos actividad antioxidante por DPPH	108
Anexo 03: Procedimientos de proteína soluble por Bradford	122
Anexo 04: Procedimientos de carbohidratos y oligosacáridos por fenol sulfúrico	135
Anexo 05: Procedimientos de alcaloides totales por púrpura bromocresol (BKP)	152
Anexo 06: Metodología de desgrasado por inmersión y agitación	160
Anexo 07: Procedimiento de determinación de materia seca	162
Anexo 08: Procedimiento de determinación de rendimiento de lupino desamargado	163
Anexo 09: Variación de peso del lupino húmedo durante el proceso de desamargado	164
Anexo 10: Resumen de análisis proximal de lupino	165
Anexo 11: Análisis de varianza de composición proximal	167
Anexo 12: Resumen de componentes de lupino sin desamargar y desamargado determinados por espectrofotometría	173
Anexo 13: Análisis de varianza de componentes de lupino por espectrofotometría	174
Anexo 14: Contenido de humedad y extracto etéreo de harina de lupino sin desamargar y desamargado	179
Anexo 15: Registro de datos de actividad antioxidante de diez genotipos de lupino	180
Anexo 16: Registro de datos de proteína soluble de diez genotipos de lupino	183
Anexo 17: Registro de datos de carbohidratos totales y oligosacáridos de diez genotipos de lupino	188
Anexo 18: Registro de datos de alcaloides totales de diez genotipos de lupino	199

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO (*L. mutabilis* y *L. a/bus*) DESAMARGADOS POR PROCESO ACUOSO

RESUMEN

Perú tiene el mayor número de genotipos de *L. mutabilis*, pero todos necesitan ser desamargados (eliminación de alcaloides) por lavado acuoso antes de su consumo. No hay información sobre el efecto del genotipo en este proceso, ni de cambios en composición y reducción de alcaloides, lo cual es necesario para las estimaciones nutricionales y de inocuidad. Esta investigación se centró en la evaluación de nueve genotipos de *L. mutabilis* de diferentes regiones y uno de *L. a/bus* cultivado localmente. Fueron determinados el aumento de peso en grano húmedo, pérdida de materia seca y análisis proximal. También carbohidratos, oligosacáridos, proteínas solubles, actividad antioxidante y alcaloides totales por metodologías espectrofotométricas. Los genotipos desamargados aumentaron el doble de su peso húmedo, redujeron su materia seca en 26% y presentaron un rendimiento en grano seco de 74%. La composición proximal de los genotipos desamargados fue similar (aumento de proteína cruda y fibra y disminución de carbohidratos y cenizas), excepto en la composición de grasa. La actividad antioxidante y oligosacáridos se redujo en rango de 10 a 60%. Los alcaloides totales se redujeron en 97% de su contenido original. Esta información permitirá a los productores y consumidores estimar los beneficios nutricionales de los granos procesados.

Palabras clave: Espectrofotometría, lupino, desamargado, nutricional, anti-nutricional

NUTRITIONAL COMPOSITION OF TEN LUPIN GENOTYPES (*L. mutabilis* Sweet and *L. albus*) DEBITTERED BY AQUEOUS PROCESSING

ABSTRACT

The largest number of genotypes of *L. mutabilis* are in Perú. All of them need to be debittered (elimination of toxic alkaloids) before consumption, by aqueous washing. However, there is no information about the genotype effect on this process, neither on the compositional changes or the alkaloid levels of reduction, which is needed for nutritional estimations and safety. This research focused on the evaluation of nine genotypes of *L. mutabilis* from different regions, and one *L. albus* cultivated locally studied as a comparison. Weight gain in hydrated grain, dry matter loss, and proximal analysis were determined. Also carbohydrates, oligosaccharides, soluble protein, antioxidant activity and residual total alkaloids by spectrophotometric methodologies. The debittered genotypes increased twice its wet weight, yield after drying was 74%, and a 26% dry matter reduction was observed. In proximal composition, debittered genotypes behavior was similar (increased crude protein and fiber and decreased carbohydrates and ash) with the exception of fat composition changes. Antioxidant activity and oligosaccharides of genotypes was reduce after debittering in a range of 10 to 60%. Total alkaloids were decreased in 97% of its original content. This information will allow producers and consumers to estimate nutritional benefits of processed grains.

Keywords: lupine debittered, nutritional, anti-nutritional, spectrophotometry

I. INTRODUCCIÓN

El *L. mutabilis Sweet* o tarwi es una fuente potencial de proteína y extracto etéreo; su mayor inconveniente como grano es la elevada presencia de alcaloides. De los miles de genotipos de *L. mutabilis* que posee el Perú solo se sabe muy poco de ellos. El sector agro nacional por medio de algunas universidades nacionales e instancias privadas, ha desarrollado el incremento de ecotipos cultivables y mejoramiento de los mismos llegando a ser el país con más variedades de *L. mutabilis* en el mundo (Neves, 1993). La información que se dispone de estos genotipos es de carácter más agrícola (Cosio *et al.*, 2010; Arauco, 2011; Neves, 1993; Castañeda, 1988); sin embargo, existen reportes nutricionales pero enfocados solamente en proteína y extracto etéreo. En tal sentido, se dispone de estudios de aprovechamiento de la proteína en forma de aislados, concentrados y harina en líneas de panificación, bebidas, cárnicos, mezclas alimenticias, insumos (Sandoval, 1987; Santana, 1984; Soto, 1983; Rodríguez, 1981; Ramírez, 1983; Huamán, 1983; Medina, 1987; Glorio, 1990; Fernández, 1989) y aprovechamiento del extracto etéreo (Castillo, 1979; Anchorena, 1999). Si bien es cierto, hay estudios de desamargado, estos son con granos en su mayor parte provenientes de Huancayo, por lo que existe falta de información sobre el efecto del desamargado en otros genotipos de diferentes zonas del Perú, los cuales no han sido aprovechadas en toda su capacidad. Es de notar que en el caso de los lupinos foráneos; estos, se han estudiado de manera más amplia, determinando componentes tales como factores antinutritivos y mejoras en la técnica de desamargado (Mostafa y Haiam, 2013; Tsaliki *et al.*, 1999; de Cortes *et al.*, 2005; Galvez, 2009; Muzquiz *et al.*, 2011; Scarafoni *et al.*, 2004; Glencross *et al.*, 2003; Martinez-Villaluenga *et al.* 2006a; Guillamón *et al.*, 2008; Glencross, 2008; Glencross *et al.*, 2003). Esta nueva información podría mejorar el potencial de consumo del *L. mutabilis* a nivel local.

Si se ofrece al mercado un *L. mutabilis* desamargado, con una mejor determinación de sus atributos nutritivos a los ya conocidos y con la seguridad de que todo componente anti-nutricional fue eliminado, mediante el uso de procesos tecnológicos accesibles, se tendrá entonces, un abanico más amplio de posibilidades para el aprovechamiento del lupino tanto en variedad, locación y atributos específicos. No solo se utilizará su muy conocida proteína y extracto etéreo, sino también atributos de carácter agregado como antioxidantes, fibra, entre

otros. Gracias al desarrollo de nuevos conocimientos sobre contenido de nutrientes del tarwi despues del desamargado dos grandes rubros alimentarios serían beneficiados: la gastronomía peruana que presenta auge mundial en los últimos años y la industria alimentaria que está en la búsqueda constante de fortificación, enriquecimiento e innovación de sus productos.

Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del genotipo del lupino en el aspecto tecnológico del desamargado acuoso a través de sus efectos en la composición nutricional y de inocuidad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Según Martínez (2005) el lupino o tarwi es una leguminosa extremadamente antigua, originaria de los Andes. En territorio nacional, su cultivo data desde hace más de tres mil años. Vásquez (1983) señala evidencias de su existencia desde la época del incanato, donde fue utilizado, como alimento básico. Luego de la llegada de los españoles, los lupinos fueron reemplazados en forma paulatina por otras leguminosas. Antunez de mayolo, citado por Gross y Bunting (1982) indican que se encontraron restos de *L. mutabilis* en tumbas de la cultura Nazca como ofrenda a los muertos (100-500 AC).

Desde sus inicios el *L. mutabilis* en Perú se ha utilizado para autoconsumo cultivado en parcelas pequeñas por los pobladores andinos y sus excedentes vendidos en ferias locales y regionales (Vásquez, 1983). El cultivo y producción del *L. mutabilis* ha tenido un antes y un después del año 1977, con el convenio entre el gobierno de Perú y la República Federal de Alemania para implementar el proyecto “Cultivo y Aprovechamiento de los lupinos” (Vásquez, 1983). Hasta antes de ese convenio el cultivo del *L. mutabilis* en Perú era mínimo, el área cosechada y producción por 16 años (1961 - 1976) era en promedio de 1200 hectáreas y 1300 toneladas anuales respectivamente, sin percepción de incremento alguno (FAO, 2013). A partir de 1977, se dió el gran salto del lupino, en solo tres años (1977 - 1979), se incrementó el área cultivada, a más del doble, de 1200 a 4500 hectáreas y la producción se cuadruplicó de 1300 a 5200 toneladas anuales, con rendimientos promedio de 1.1 ton/Ha (FAO, 2013). En este ambiente de crecimiento, en el año de 1980, el Perú fue la sede de la primera conferencia internacional de lupino desarrollada en Cuzco (*Proceedings of the first international lupine workshop*), donde Perú presentó muchos trabajos de investigación realizados en *Lupinus mutabilis*. Los tópicos investigados fueron sobre extracto etéreos (extracción de extracto etéreo, determinación de ácidos grasos), proteínas (obtención de aislados proteicos, valor biológico, estudio aminoacídico) factores anti nutricionales (ácido cianhídrico, hemaglutinina, inhibidor de tripsina, alcaloides por cromatografía), tecnología de desamargado (desamargado con alcohol y agua) (Gross y Bunting, 1982). La cadena productiva del estuvo encaminada y completa, ya que se

aperturó plantas piloto de proceso y comercialización del *L. mutabilis* en Cañete y Piura. Sin embargo desde 1980 la cadena productiva de lupino fue debilitada y quebrada por muchos factores como el climático y tecnológico, de allí que empezó su inconstancia y decaimiento. En el año de 1980 la producción disminuyó debido a una grave sequía que afectó a gran parte de la sierra. En años subsiguientes los problemas tecnológicos aparecieron, los procesadores de Cañete no encontraron resultados satisfactorios en el desamargado de la torta de lupino, lo que ocasionó que la industria privada perdiera interés en la adquisición de esta leguminosa, desalentando a los productores, lo que resultó en una disminución del cultivo del tarwi (Vasquez, 1983). La producción del *L. mutabilis* en el periodo de 1980 - 1994 se detuvo, en valores promedio de 4000 hectáreas, 3400 toneladas anuales y bajos rendimientos de 0.8 ton/Ha. Frente a dicha problemática la cadena productiva tuvo que ser reforzada, el sector agronómico busco mejoramiento genético, ampliación de genotipos del *L. mutabilis* para distintas zonas del territorio nacional y adaptación de nuevas especies de lupinus como *L. albus* y *L. angustifolius* (Neves, 1993). En el sector tecnológico, algunos investigadores empezaron a buscar otras formas de aprovechamiento de proteína del tarwi, se realizaron estudio de aplicación de harina en líneas de panificación, bebidas, cárnicos, mezclas alimenticias, insumos (Sandoval, 1987; Santana, 1984; Soto, 1983; Rodríguez, 1981; Ramírez, 1983; Huamán, 1983; Medina, 1987; Glorio, 1990; Fernández, 1989, Anchorena, 1999); en el sector comercial se abrieron plantas artesanales en Cajamarca, Huancayo y Cuzco para desamargado de lupino para ser vendidos en forma de menestra y harina , y finalmente en el sector promoción, profesores, promotores de salud y técnicos agropecuarios realizaron seminarios, talleres en diversos departamentos del territorio nacional (Engelmann, 1983). Los resultados para el tarwi nacional no tardaron en llegar ya casi al finalizar el siglo XX (1995 - 1999) se pudo percibir un incremento de 4000 a 7000 hectáreas cultivadas, una producción de 3400 a 7800 toneladas anuales y aumento de rendimiento promedio de 0.8 a 1 ton/Ha (FAO, 2013). El tarwi estaba recapturando la atención del consumidor. El refuerzo de la cadena productiva mantuvo a flote el cultivo del tarwi saliendo de su estancamiento y posible desaparición.

2.2 SITUACIÓN ACTUAL

La cadena productiva del *L. mutabilis* de Perú en la actualidad ha caído en una nueva situación de estancamiento. Según la FAO (2013) desde el año 2000 hasta el 2011 el área cosechada de *L. mutabilis* en Perú permanece dentro del rango de 8000 a 9000 hectáreas de cultivo anuales con niveles de producción de 9000 ton anuales y un rendimiento de 1 ton/Ha; misma situación sufrida en el periodo de 1983 a 1993. Cabe resaltar un incremento de producción a partir del año 2010 a 11000 toneladas anuales. Esto da señales de trabajo por parte del sector agrícola, sin embargo dichos valores son mínimos si son comparados a nivel internacional. Según la FAO (2013) Chile presentó una producción de tarwi en los últimos diez años (2002 - 2011), de 30 000 a 70 000 toneladas anuales generalmente con tendencia de crecimiento significativo y el sector europeo aun más, aunque en otras especies como *L. albus*, *L. angustifolius* o *L. luteus*. Si bien, los mayores rendimientos en el extranjero, se pueden atribuir a un mayor territorio de cultivo en esos países. No hay duda que el cultivo de *L. mutabilis* peruano que alguna vez estuvo en la cúspide internacional por su elevado valor proteico y extracto etéreo ahora está quedando rezagado por otros países.

Analizando el sector de tecnología de transformación se observa una decadencia total en nuevas investigaciones y más aun, se está descuidando el estudio de los miles de genotipos que viene desarrollando el sector agro (Cosio *et al.*, 2010; Arauco, 2011; Neves, 1993; Castañeda, 1988). Si bien es cierto, existen reportes de investigación en la ya frecuente, faceta proteica y extracto etéreo (aprovechamiento de propiedades funcionales y obtención de aislados proteicos, calidad de extracto etéreo insaturada) (Sosa, 2000; Cáceres, 2012; Villaverde, 2011; Castañeda *et al.*, 2008); éstos lamentablemente aprovechan un número limitado de ecotipos de lupino. Si se considera los miles de ecotipos en Cuzco según Cosio *et al* (2010) solo se observan estudios de contenido proteico y extracto etéreo, o de tipo morfológico. Hace falta un impulso de investigación y divulgación sobre las nuevas potencialidades nutritivas del lupino y mejoramiento de su tecnología de transformación. De solucionar dicho problema, la cadena productiva del *L. mutabilis* volvería a incrementarse como ya se observa en otros lugares y como lo registran los antecedentes históricos de la región.

2.3 LUPINO

El lupino es una leguminosa que crece en una planta de hojas de colores (azul, violeta, blanco, magenta o bicolor) (López, 1977; Cárdenas, 1977) y es de suma importancia por su elevado contenido de proteína y extracto etéreo (40 y 20% respectivamente) y su gran adaptabilidad agronómica que presenta en suelos desfavorables (fija nitrógeno atmosférico a través de la raíz, no requiere fertilizantes y es resistente a plagas) (Chavez y Untied, 1979; Gross, 1982; Jacobson y Mujica, 2006; ILC, 2005 citado por Ortega *et al.*, 2010; Neves, 1993). Planchuelo (1999) reporta que existen alrededor del mundo aproximadamente 1700 especies de lupino pero se las podría agrupar en solo dos: Lupino dulce y Lupino amargo. El primero, con contenido de alcaloides menor a 0.05% y el segundo de 1 a 2% (FAO, 1982). Las especies más conocidas como *L. albus*, *L. Angustifolius*, *L. luteus* y *L. mutabilis* en la actualidad existen en su forma dulce y amarga, pero se ha ido incrementando los del tipo dulce mediante mejoramiento genético (Martinez, 2005). Von Sengbush'en Alemania en 1928, obtuvo por selección genética los primeros tipos de lupinos dulces, con bajos niveles de alcaloides (Cárdenas, 1977; Von Baer, 1986). Las especies como *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus* son originarios de la zona mediterránea de Europa y por el lado Americano el *L. mutabilis* (Gross, 1982).

Según Neves (1993) en el Perú se tiene más de 3000 genotipos de la especie *Lupinus mutabilis Sweet*, valor superior en todo el mundo. Se le puede cultivar a nivel del mar, sin embargo su hábitat común es zonas elevadas (2500 a 3800 msnm) (Blanco, 1974). Esto es de suma importancia para las poblaciones alto andinas de baja economía que tiene poco consumo de proteína animal (Chávez y Untied, 1979). El *L. mutabilis Sweet* en Perú es conocido bajo dos nombres, chocho por el norte (Cajamarca) y tarwi por centro y sur (Huaraz, Huancayo, Huánuco, Ayacucho, Apurímac, Cusco y Puno), la diferencia entre ambos radica en que el chocho es una planta anual y bianual y el tarwi solo anual (Cowlin *et al.*, 1998). El *L. mutabilis sweet* contiene elevado contenido de proteína inclusive superior a muchas especies de lupino conocidas (Gross, 1982a), pero también se conoce su factor limitante, su elevado contenido de alcaloides (Muzquiz *et al.*, 2011).

La FAO (1982) ha descrito las características taxonómicas y fisiológicas del lupino y se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Características taxonómicas y fisiológicas del lupino

Clasificación sistemática	:	Lupino
Orden	:	Rosales (Fabales)
Sub-orden	:	Leguminosinae
Familia	:	Leguminosae (Fabaceae)
Sub-familia	:	Papilionaceae (Faboideae); papilionatae; lotoideae; ginisteae
Tribu	:	Genistinae
Sub-tribu	:	Genistinae (Crotalariinae)
Genero	:	<i>Lupinus</i>
Sub-genero	:	Eulupinus plantas anuales
Especie	:	<i>Lupinus mutabilis</i> sweet <i>Lupinus cruckshasii</i> Hooder <i>Lupinus tauris</i> Hooder <i>Lupinus tricolor</i> sodiro
Sub-especie	:	<i>Lupinus mutabilis</i> chocho <i>Lupinus mutabilis</i> tarwi

FUENTE: FAO (1982)

2.4 COMPOSICIÓN PROXIMAL

El *L. mutabilis*, tarwi o chocho es una leguminosa andina con mucho potencial nutritivo frente a otras especies y otras leguminosas, como se describe más adelante.

2.4.1 PROTEÍNA

La proteína es uno de los componentes más importantes del lupino. Perú tiene la ventaja de poseer una de las especies de lupino (*L. mutabilis*) con mayor contenido de proteína que otras especies (Kay, 1985). Castillo (1979) reporta que las proteínas del *L. mutabilis* se encuentran en mayor proporción en la semilla que en la cáscara (45.26 y 5.35% respectivamente). Dicha referencia permite un mejor manejo del grano en su aspecto tecnológico. En el Cuadro 2 se reporta que el *L. mutabilis* es la especie de lupino con más contenido proteico (cerca de 50%) frente a otras cultivadas en Europa y América. Pueden existir o aparecer otras especies europeas con elevado contenido proteico, como el caso del

L. luteus de Polonia que también posee contenido de 40 a 50% (Sujak *et al.*, 2006), sin embargo muchas de ellas provienen de centros de mejoramiento genético.

Cuadro 2: Contenido de proteína de diferentes especies de lupino y leguminosas

Leguminosas	Origen	Proteína cruda (%) bs
<i>L. mutabilis</i> ^a	-	42.6
<i>L. mutabilis</i> cv. Huancayo ^{cb}	PERÚ	39.8 - 46.83
<i>L. mutabilis</i> amargo ^c	ECUADOR	41.4 - 47.21
<i>L. mutabilis</i> ^g	PERÚ	32.2
<i>L. albus</i> ^a	-	36.7
<i>L. albus</i> cv. Amiga ^b	PERÚ	25.5
<i>L. albus</i> cv. Astra ^b	PERÚ	38.1
<i>L. albus</i> ^d	EGIPTO	38.6
<i>L. albus</i> ^f	MEXICO	38.02
<i>L. albus</i> ^h	POLONIA	35.1 - 37.6
<i>L. angustifolius</i> ^a	-	31.1
<i>L. angustifolius</i> ^h	POLONIA	29.5 - 35.6
<i>L. luteus</i> ^a	-	41.8
<i>L. luteus</i> ^h	POLONIA	44.7 - 48.2
Soja ^g	-	31.9 - 36.8
Otras leguminosas ^g	PERÚ	23 - 27

FUENTE: a) Gross (1982a); b) Gross y Baer (1977); c) Sosa (2000); Anchorena (1999) y Castillo (1979); d) Mostafa *et al* (2013); e) Villacreces (2011) y Villaverde (2011) ; f) Alvarado (2006); g) Ministerio de Salud e Instituto de salud (2009); Jacobsen y Mujica (2006); Morón (2005); h) Sujak *et al* (2006)

El *L. mutabilis* esta cultivado en todo el mundo y con similares características. Villacreces (2011) y Villaverde (2011) reportan que el *L. mutabilis* de Ecuador contiene de 41.1 a 47.21% de proteína. Existe una gran brecha de Perú frente a otros países ya que se posee más de 3000 genotipos de *L. mutabilis* en territorio nacional (Neves, 1993). Respecto a otras leguminosas cultivadas en Perú, todas poseen contenido de proteína muy inferior al lupino (23 - 27%) y la soja por su lado no alcanza el 40% de proteína (Ministerio de Salud e Instituto de salud, 2009; Jacobsen y Mujica, 2006; Morón, 2005). Entonces, dentro de las leguminosas en base al contenido proteico, el *L. mutabilis* ocupa el primer lugar. Czubinski *et al* (2014) señalan que las proteínas que están presentes en la mayoría de los lupinos son las globulinas y albúminas. Según Cheftel (1989) estas proteínas son importantes porque

participan en procesos biológicos (transporte, protección, reserva, entre otros). En el área tecnológica, la proteína del *L. mutabilis* tiene un campo de aplicación vasto: (a) producción de aditivos como concentrados y aislados proteicos de buenos rendimientos y propiedades funcionales (Sosa, 2000; Rodríguez, 1981; Gross y Bunting, 1982), (b) Producción y/o fortificación de productos en su forma harina de tarwi, en la aplicación de productos cárnicos, productos deshidratados, panes, tamales, galletas, bebidas proteicas, sopas instantáneas, entre otros (Cáceres, 2012; Glorio, 1990; Fernández, 1989; Sandoval, 1987; Soto, 1983; Huamán, 1983; Medina, 1987).

La calidad de una proteína no solo está definida por su cantidad sino por su valor biológico. Respecto a su contenido aminoacídico Moreno (2008) reporta que tanto el tarwi como la soja presentan un perfil aminoacídico similar, con valores muy cercanos al requerimiento aminoacídico establecido por la FAO. El tarwi es deficiente en metionina (21.44 mg AA/g proteína) y con buen nivel de lisina (52.96 mg AA/g proteína), por ello se puede complementar muy bien con los cereales deficientes en lisina y ricos en metionina, logrando así buena calidad biológica (Relación de Eficiencia Proteica (PER) y Porcentaje de Digestibilidad) (Gross, 1982; Espinoza *et al.*, 1984; López, 1987; Martínez, 1987). El Tarwi crudo presenta valores de PER de 0.5 - 1.34, complementado puede lograr un PER de 2.5 (PER de la caseína). Combinado con un solo cereal, el tarwi normalmente no alcanza el valor PER óptimo, se requiere más de un cereal para lograr este objetivo, como por ejemplo el caso de la combinación de tarwi, quinua y cebada (33 : 33 : 33) (Tapia *et al.*, 2006, citado por Villaverde, 2011). Referido a la digestibilidad, según Rodríguez *et al* (1982) el tarwi crudo posee una digestibilidad de 85.3% y se pretende con las mezclas lograr un valor de 100% de digestibilidad (valor de la caseína). Por otro lado Glencross *et al* (2008a) reporta que la soja en grano presenta mayor digestibilidad que el *Lupinus angustifolius*.

Al hablar de proteínas es necesario diferenciar definiciones entre proteína cruda y proteína soluble. La mayoría de la literatura reporta proteína cruda (proteína total), por su parte la proteína soluble forma parte de la proteína cruda. De acuerdo a la metodología la determinación de proteína cruda por Kjeldhal se basa en la cuantificación de nitrógeno presente en la muestra digerida, hidrolizada; la proteína soluble por su lado cuantifica netamente proteína no hidrolizada mediante diversos métodos como Lowry, Biuret o

Bradford los cuales se basan en solubilizar las proteínas no digeridas en solventes salinos y luego mediante reacción colorimétrica medir su concentración. Aunque el método colorimétrico es más rápido, menos costoso y cuantifica proteína no hidrolizada posee un margen de error superior al Kjeldhal por el gran número de interferentes que se presentan en su determinación.

2.4.2 EXTRACTO ETÉREO

Según Castillo (1979) el extracto etéreo (aceite) en el *L. mutabilis* se encuentran mayormente en la semilla que en la cáscara (19.88 y 1.13 % respectivamente), lo que permite un mejor manejo del grano en su aspecto tecnológico. El del *L. mutabilis* ha sido objeto de varios estudios por su elevado contenido y calidad que presenta frente a otras especies (Ver Cuadros 3 y 4). En comparación con leguminosas cultivadas en Perú, según el Ministerio de Salud e Instituto de salud (2009) el tarwi presenta un contenido de extracto etéreo superior a todas las leguminosas como la arveja, frijol, haba, lenteja e inclusive la soja. Según Jacobsen y Mujica (2006) el tarwi posee en su mayoría igual o mayor contenido de extracto etéreo que la soja.

Uno de los parámetros de calidad del extracto etéreo es su contenido de ácidos grasos; es mejor cuando el contenido de ácidos grasos insaturados (AGPI) es mayor que los saturados (AGS). Cárdenas (1977), Burbano *et al* (1982) y Scott *et al* (1982) señalan que los ácidos grasos insaturados son los que se encuentran en mayor proporción en el lupino, en especial el ácido oleico (18:1, Omega 9) seguido del linoleico (18:2, Omega 6) y linolénico (18:3, Omega 3).

En el cuadro 4, Anchorena (1999) reporta que el *Lupinus mutabilis* posee mayor contenido de ácidos grasos poli insaturados (Oleico, Linoleico y Linolénico) que ácidos grasos saturados (Palmítico y Esteárico). Señala que el ácido graso insaturado linolénico a pesar de ser esencial, no es tan deseable ya que es el causante de la reversión del sabor del extracto etéreo (sabor a frijol) y el primero en oxidarse provocando rancidez; se reportan valores de 2 a 2.9% para el ácido linolénico presentes en el tarwi (Jacobsen y Mujica, 2006 y Anchorena, 1999).

Cuadro 3: Contenido de extracto etéreo de diferentes especies de lupino

Leguminosas	Origen	Extracto etéreo (%) bs
<i>L. mutabilis</i> ^a	-	18.5
<i>L. mutabilis</i> ^b	-	17 -23
<i>L. mutabilis</i> ^c	PERÚ	20.1
<i>L. mutabilis</i> cv. Huancayo ^d	PERÚ	24.11
<i>L. mutabilis</i> ^e	PERÚ	32.6
<i>L. mutabilis</i> ^f	PERÚ	16.5
<i>L. luteus</i> ^a	-	5.4
<i>L. angustifolius</i> ^a	-	6.0
<i>L. albus</i> ^a	-	11.5
<i>L. albus</i> ^a	-	9 - 12
Soja ^e	-	21.4
Soja ^f	-	16.4
Otras leguminosas	PERÚ	< 2

FUENTE: a) Gross (1982a); b) Kay (1985), Aguilera-Trier (1978) y Gross-Baer (1977); c) Schoeneberger *et al* (1981); d) Sosa (2000); e) Ministerio de Salud e Instituto de salud (2009); f) Jacobsen y Mujica (2006).

Cuadro 4: Contenido de ácidos grasos de lupino y otras leguminosas

Leguminosa	Origen	AGI (%) bs	AGS (%) bs	Ac. Oleico Omega 9 (18:1) (%) bs	Ac. Linoleico Omega 6 (18:2) (%) bs	Ac. Linolenico Omega 3 (18:3) (%) bs
<i>L. mutabilis</i> Hyo ^a	PERÚ	83.97	13.77	46.8	34.7	2.47
<i>L. mutabilis</i> ^c	PERÚ	80.60	20.10	40.4	37.1	2.9
<i>L. mutabilis</i> Hyo ^d	PERÚ	80.92	19.07	51.08	29.84	-
<i>L. mutabilis</i> ^f	ECUADOR	80.60	20.10			
<i>L. mutabilis</i> ^g	PERÚ			53.87	25.89	2.57
<i>L. albus</i> ^b				50 - 60	16 - 23	
<i>L. albus</i> ^e	EGIPTO	88.36	11.64	43.82	32.19	6.27
Soja ^g	-	74.5 - 92.8		23.5 - 30.8	49 - 51.5	2 - 10.5

FUENTE: a) Anchorena (1999); b) Boschini *et al* (2008); c) Jacobsen y Mujica (2006); d) Castillo (1979); e) Mostafa *et al* (2013); f) Montatixe (2005); g) Schoeneberger *et al* (1981)

Comparando las especies de lupino, de acuerdo a los reportes mostrados en el Cuadro 4, los lupinos aun de diferentes locaciones muestran un contenido de ácidos grasos semejante. Haciendo una comparación con la soja Cubero y Moreno (1983) señalan que tanto el lupino como la soja presentan una composición de ácidos grasos similar en mayor cantidad en ácidos grasos insaturados. Schoeneberger *et al.*, (1981) reportan que el extracto etéreo de tarwi posee mayor cantidad de ácido oleico, menor en linoleico y semejante en linolénico que la soja, por tanto su contenido de ácidos grasos insaturados puede llegar a ser mayor que del lupino (Ver cuadro 4).

2.4.3 FIBRA CRUDA

La fracción fibrosa se encuentra mayormente en la cáscara (tegumento) (58 - 88 %) frente al cotiledón (2 %) del lupino (Ortega *et al.*, 2010; Espinoza *et al.*, 1984). Castillo (1979) confirma contenidos similares de fibra en el *Lupinus mutabilis* 54.7% en la cáscara y 8.15% en el cotiledón. El *L. mutabilis* posee menos fibra cruda que las otras especies de lupino, pero más fibra que otras leguminosas como la soja (Ver Cuadro 5).

Cuadro 5: Contenido de fibra cruda de diferentes especies de lupino y otras leguminosas

Leguminosas	Origen	Fibra cruda (%) bs
<i>L. mutabilis</i> ^a	-	6 - 8
<i>L. mutabilis</i> ^{bc}	PERÚ	7.1
<i>L. mutabilis</i> cv Huancayo ^d	PERÚ	2.8
<i>L. mutabilis</i> cv amargo ^e	PERÚ	6.5
<i>L. albus</i> ^a	-	9.8
<i>L. angustifolius</i> ^a	-	14.7
<i>L. luteus</i> ^a	-	15.8
Soja ^b	-	5.2
Soja ^c	-	5.7
Soja ^e	-	4.6
Otras leguminosas ^b	PERÚ	< 7

FUENTE: a) Ortega *et al* (2010) ; Gross (1982a); Gross y Baer (1977); b) Ministerio de salud e Instituto de Salud (2009); c) Jacobsen-Mujica (2006), Moron (2005); d) Sosa (2000); e) Schoeneberger *et al* (1981)

Es importante notar que la Fibra cruda (Fibra bruta) es una forma rápida de determinación de la fibra dietaria total. Según Slavin (1987) la fibra cruda solo determina la tercera o quinta parte de la fibra dietaria total, por ello solo se utiliza como referente. La fibra dietaria esta conformada por fibra dietaria soluble (pectina, gomas y mucílagos) y la fibra dietaria insoluble (celulosa, hemicelulosa y lignina). Los valores reportados muestran menor valor de fibra dietaria soluble que la insoluble (menor de 20% y mayor de 30% respectivamente) (Eggum *et al.*, 1993; Martinez-Villaluenga, 2006). Es decir con 50% de fibra dietaria total la fibra cruda no sobrepasaría el 20% en contenido.

Según Gorecka *et al* (2000) la fibra dietaria insoluble juega un rol importante en la fisiología humana por sus propiedades funcionales (capacidad de retención de agua, capacidad de intercambio catiónico y formación de geles), evitando así enfermedades gastrointestinales. Por su lado la fibra soluble es muy utilizada en el campo tecnológico alimentario como aditivo (formación de geles, espesantes, estabilizantes), sin embargo también ayuda en la disminución de colesterol. Huygue (1997) reporta que la fibra del lupino presenta elevada capacidad de retención de agua (7.1 g H₂O/g lupino) lo cual hace útil a la harina integral de lupino como componente en productos dietarios, ya que se conoce que la fibra ayuda en el metabolismo de la glucosa, transporta micronutrientes y disminuye la absorción de colesterol (Chapleau-Lamballerie, 2003; Hall *et al.*, 2005; Sirtori *et al.*, 2004). Ortega *et al* (2010) reportan que la fibra del *Lupinus mutabilis* procedente de Colombia es rica en celulosa, hemicelulosa y lignina (37, 7 y 30 % respectivamente), en proporción mayor en la cáscara que el cotiledón considerándose de elevado valor nutritivo.

2.4.4 CARBOHIDRATOS

Según Castillo (1979) los carbohidratos totales en el *Lupinus mutabilis* se encuentran mayormente en la cáscara que en el cotiledón (35.45 y 20.15 % respectivamente), lo que permite un mejor manejo del grano en su aspecto tecnológico. En el Cuadro 6 se observa que el contenido de carbohidratos entre especies de lupino varia de 30 a 40%, estando el *L. mutabilis* como rango inferior (alrededor de 30%).

Cuadro 6: Contenido de carbohidratos de diferentes especies de lupino y otras leguminosas

Leguminosas	Origen	Carbohidratos (%) bs
<i>L. mutabilis</i> ^a	-	27.3
<i>L. mutabilis</i> cv Huancayo ^c	PERÚ	29.8
<i>L. mutabilis</i> ^d	PERÚ	28.4
<i>L. mutabilis</i> ^e	PERÚ	32.2
<i>L. mutabilis</i> ^f	PERÚ	28.2
<i>L. albus</i> ^a	-	37.8
<i>L. albus</i> ^b	POLONIA	33.9
<i>L. angustifolius</i> ^a	-	43.1
<i>L. angustifolius</i> ^b	POLONIA	42.5
<i>L. luteus</i> ^a	-	35.0
<i>L. luteus</i> ^b	POLONIA	29.5
Soja ^d	-	27.5
Soja ^e	-	40.4
Soja ^f	-	35.5
Otras leguminosas ^e	PERÚ	> 60

FUENTE: a) Gross (1982a); b) Sujac *et al.*, (2006); c) Sosa (2000); d) Schoeneberger *et al* (1981); e) Ministerio de Salud e Instituto de Salud (2009); f) Jacobsen y Mujica (2006) y Morón (2005)

Comparando su contenido de carbohidratos con otras leguminosas, el lupino tiene mucha semejanza a la soja, pero muy por debajo de las demás leguminosas que sobrepasan el 60% de carbohidratos. Esto es una ventaja ya que los carbohidratos junto al almidón, azúcares, pectina útiles en el campo tecnológico alimentario, también presentan los polisacáridos no-almidonaceos (NSP) como los oligosacáridos que ocasionan problemas digestivos al ser consumidos (Sujak *et al.*, 2006). Entonces presentar un contenido de carbohidratos menor a todas las leguminosas no sería desventajoso, considerando su bajo contenido glicémico.

Referido a los azúcares del lupino Erbas *et al* (2005) reporta que son benéficos para el uso de productos fermentados (panadería y pastelería). Por otro lado Diaz (1990) y Gross-Tuesta (1977) señalan que el tarwi presenta bajo contenido de sacarosa lo cual lo hace útil en productos para diabéticos.

2.4.5 CENIZAS

Según Castillo (1979) las cenizas en el *L. mutabilis* se encuentran en igual proporción en la cáscara que en el cotiledón (3.11 y 3.79 % respectivamente), lo que permite un mejor manejo del grano en su aspecto tecnológico. En el Cuadro 7 se observa que el contenido de cenizas de todas las especies de lupino están en un rango de 3 a 4%, similar a los valores de las leguminosas e inferior a la soja. (Ministerio de Salud e Instituto de Salud, 2009; Jacobsen-Mujica, 2006 y Morón, 2005). Respecto a los minerales que contiene, Ortega *et al* (2006) reportan que el *Lupinus mutabilis* procedente de Colombia posee elevados niveles de macronutrientes como fósforo y potasio, y de micronutrientes como el hierro, pero bajos niveles de minerales esenciales como el magnesio y calcio. Aunque la mayor parte de los minerales se encuentra en los cotiledones, el hierro y magnesio se encuentran en el tegumento (cáscara). (Ver Cuadro 8). Por otro lado el *Lupinus mutabilis* de Perú (tarwi) posee un contenido mineral promedio como todas las leguminosas pero totalmente inferior a la soja (Ministerio de Salud e Instituto de Salud, 2009).

Cuadro 7: Contenido de cenizas de diferentes especies de lupino

Leguminosas	Origen	Cenizas (%) bs
<i>L. mutabilis</i> ^a	-	3.7
<i>L. mutabilis</i> cv Astra Huancayo ^b	PERÚ	4.1
<i>L. mutabilis</i> ^e	PERÚ	3.3
<i>L. albus</i> ^a	-	3.4
<i>L. albus</i> ^c	POLONIA	3.9
<i>L. angustifolius</i> ^a	-	3.5
<i>L. angustifolius</i> ^c	POLONIA	3.7
<i>L. luteus</i> ^a	-	4.1
<i>L. luteus</i> ^c	POLONIA	4.6
Soja ^{dc}	-	5.5 - 6.2

FUENTE: a) Gross (1982a); b) Gross y Baer (1977); c) Sujak *et al* (2006); d) Ministerio de Salud e Instituto de Salud (2009); e) Jacobsen-Mujica (2006) y Morón (2005).

En otro reporte, The International Lupin Association (1999) citado por Rodríguez (2009) muestra datos de macronutrientes para el lupino de 107 - 153 mg/100 g en calcio, 200 - 302 mg/100 g en magnesio, 25 - 75 mg/100 g en sodio, 110 - 135 mg/100 g en potasio, y

44 - 88 mg/100 g en fósforo. En micronutrientes de 4.6 - 7.3 mg/100 g en hierro, 4 - 5.1 mg/100 g en Zinc, 2.1 - 2.9 mg/100 g en manganeso y 0.4 - 1.12 mg/100 g en cobre.

Con algunas excepciones como el caso del Zinc, el tarwi en su aporte mineral está después de la soja, sin embargo eso no le quita que puede ser aprovechado como cualquier otra leguminosa para fortificar productos.

Cuadro 8: Contenido de minerales del tarwi, soja y algunas leguminosas (mg de mineral/100 g muestra) bs

Componente	Tarwi	Soja	Arveja	Frijol	Haba
Calcio	100.56	355.61	98.54	112.27	222.60
Fósforo	48.790	85.957	48.905	44.792	46.667
Zinc	8.85	5.54	4.53	3.23	-
Hierro	4.28	9.40	6.20	8.68	14.69

FUENTE: Ministerio de Salud e Instituto de Salud (2009)

2.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

El lupino no solo es una valiosa fuente nutritiva de proteína, extracto etéreo, fibra, minerales y vitaminas; también contiene fitoquímicos con capacidad antioxidante como los polifenoles (compuestos Fenólicos) principalmente taninos y flavonoides (Oomah *et al.*, 2006; Tsaliki *et al.*, 1999). La potencialidad de las leguminosas como antioxidantes naturales puede ser atribuida a muchos componentes. Para el *L. mutabilis sweet* de Perú, Galvez (2009) lo atribuye a las isoflavonas. Adlercreutz-Mazur (1997) reporta que las isoflavonas tienen efectos benéficos en la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y síntomas de menopausia; también, protegen al cuerpo humano del daño producido por los radicales libres o moléculas pro-oxidantes. (Kahkonen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996; Al-Saikhan *et al.*, 1995). Para el *L. albus* de Grecia, Tsaliki *et al.* (1999) atribuye la actividad antioxidante a los fenoles, fosfolípidos y ácidos péptido/amino presentes; y en la soja en forma similar a la presencia de tocoferoles, fosfolípidos, flavonoides, aminoácidos, péptidos. (Hayes *et al.*, 1977; Pratt-Birac, 1979; Pratt *et al.*, 1981). En el lado tecnológico, Pratt (1992) señala que los antioxidantes retardan la rancidez de los alimentos, producto de la oxidación de ácidos grasos

insaturados. Por su ubicación, Gálvez *et al* (2009) reportan que la capacidad antioxidante del lupino está presente en contenido significativamente mayor en el cotiledón (más del 80%) y el resto distribuido entre la cáscara y el hipocotilo.

Cuadro 9: Actividad antioxidante de lupino

Leguminosas	Origen	Actividad Antioxidante DPPH ($\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$)	Isoflavonas (mg genisteina/100 g de muestra) (bh)
<i>L. mutabilis</i> cv. SLP-1 ^a	PERÚ	114	16.2
<i>L. mutabilis</i> cv. SLP-4 ^a	PERÚ	105	15.9
<i>L. mutabilis</i> cv. H-6 ^a	PERÚ	251	35.2
<i>L. mutabilis</i> cv. SCG-22 ^a	PERÚ	98	16.7
<i>L. mutabilis</i> cv. Andares ^a	PERÚ	95	14.0
<i>L. mutabilis</i> cv. Yunguyo ^a	PERÚ	90	13.8
<i>L. albus</i> ^a	BRASIL	142	0.1
<i>L. albus</i> ^b	POLONIA	678	
<i>L. angustifolius</i> ^a	BRASIL	71	-
<i>L. angustifolius</i> ^b	POLONIA	747	
<i>L. luteus</i> ^b	POLONIA	903	
Soja ^a	BRASIL		57 - 188
Soja ^a	BRASIL		116 – 274
Soja ^b	TAILANDIA	700	

FUENTE: a) Galvez *et al.* (2009); b) Siger *et al.* (2012); c) Ratana *et al.* (2010)

En el Cuadro 9 se observa que la actividad antioxidante del lupino es mayor en las especies europeas que las especies sudamericanas. La diferencia podría ser atribuida a que los lupinos europeos provienen de plantas de mejoramiento genético (Siger *et al.*, 2012). Galvez *et al.* (2009) reporta que el *L. mutabilis* cv H6 (Huancayo-Perú), presenta la mayor actividad antioxidante que los otros ecotipos de *L. mutabilis*. En comparación con otras leguminosas, Tsaliki *et al.* (1996) reporta que el *Lupinus albus* de Grecia (harina de grano sin desamargar y aislado) presenta mayor actividad antioxidante que la harina de soja. Por otro lado Galvez *et al.* (2009), reporta que la actividad antioxidante del *L. mutabilis* frente a la soja es mucho menor, en base al contenido de isoflavonas (Ver Cuadro 9). Por otro lado Ratana *et al.* (2010) reportan que la soja presenta una actividad antioxidante de 700 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ muestra en el metodo de DPPH. De una comparación del lupino con otros

alimentos se puede señalar que en contenido antioxidante está casi al mismo nivel del Té verde y muy superior a la zanahoria (Ver Cuadro 10).

Cuadro 10: Contenido antioxidante de diferentes productos alimenticios

Producto alimenticio	Actividad Antioxidante* ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ gms}$)
Leche de almendras	131 \pm 76
Jugo de zanahoria	172 \pm 38
Yogurt	561 \pm 136
Te verde	644 \pm 55
Cereal de avena	1739 \pm 302
Jugo de arandanos	1859 \pm 144
Vino tinto	1935 \pm 102
Jugo de granada	3901 \pm 289

*Media \pm desviación estandar (n= 18 repeticiones)

FUENTE: Adaptado de Plank *et al.* (2012)

2.6 FACTORES ANTINUTRICIONALES

Los factores anti-nutricionales (ANF) son sustancias biológicamente activas producidas por las plantas esencialmente como mecanismo de defensa químico frente a predadores (Francis *et al.*, 2001), sin embargo dichos componentes limitan el valor biológico de la planta como alimento y aceptación del consumidor ya que interfieren en su palatabilidad, digestión y metabolismo (Aguilera *et al.*, 2009). De la amplia variedad existente de factores anti-nutricionales Francis *et al.* (2001) señalan que los más importantes en el lupino son los alcaloides y los oligosacáridos; los otros factores como los fitatos, saponinas, taninos, inhibidores de proteasa, lectinas se encuentran en cantidades menores comparadas con otras leguminosas. Con respecto al ácido cianhídrico, Gross y Bunting (1982) reportan que el lupino como otras leguminosas presenta valores muy por debajo del límite máximo permitido. Erdemuglo *et al.* (2007) y Zamora *et al.* (2008a) clasifican a los factores anti-nutricionales presentes en leguminosas según su comportamiento en proceso: (a) lábiles: lectinas, inhibidores de tripsina, antivitaminas y goitrogenos y (b) estables al calor: Saponinas, Estrógenos, Cianógenos, Fitatos, Alcaloides, Oligosacáridos y Taninos.

Se reporta que los ANF lábiles son aquellos fácilmente eliminados, mientras que los estables al calor, requieren mas proceso.

2.6.1 OLIGOSÁCARIDOS

Son azúcares llamados también α -Galactósidos (conformados por tres galactosas y una sacarosa (α -1,6)), los más estudiados son: la Rafinosa, la Estaquiosa y la Verbascosa. Son considerados factores anti-nutricionales porque estos no son hidrolizados en el tracto gastrointestinal por la ausencia de la α -galactosidasa; por tanto, se fermentan anaerómicamente por microorganismos y como resultado se da la producción de gases (H_2 , CO_2 , CH_4), dolor abdominal y disenterías (Aguilera *et al.*, 2009; Price *et al.*, 1988, Saini, 1989). Segun Francis *et al.* (2001) dentro de las leguminosas los oligosacáridos tienen la misma importancia de estudio que los alcaloides por su toxicidad.

Cuadro 11: Contenido de oligosacáridos de diferentes especies de lupino y algunas leguminosas

Lupinos	Origen	Oligosacáridos Totales (%) bs
<i>L. luteus</i> var 4486 ^a	ESPAÑA	11.11
<i>L. luteus</i> var 4492 ^a	ESPAÑA	12.29
<i>L. albus</i> var Multolupa ^a	ESPAÑA	7.56
<i>L. albus</i> var Marta ^a	ESPAÑA	8.51
Lupino ^b	-	7-15
<i>L. marieae josephi</i> ^c	ESPAÑA	7.9
<i>L. mutabilis</i> cv. Inti ^d	CHILE	13.5
<i>L. mutabilis</i> cv. Linea 1250 ^d	CHILE	13.9
<i>L. angustifolius</i> ^e	-	5.0
Leguminosas		
<i>Soja</i> ^e	-	6.0
<i>Frijol</i> ^f	ESPAÑA	1.8 - 3.4

FUENTE: a) Martínez-Villaluenga *et al.* (2006); b) Glencross (2001); Martínez-Villaluenga *et al.* (2005); c) Muzquiz *et al.* (2011); d) Gross *et al.* (1988); e) Glencross *et al.* (2003); f) Muzquiz *et al.* (1999a)

En el Cuadro 11 se observa que los lupinos varían su contenido de oligosacáridos totales de 7 a 15% tal como lo reporta Glencross (2001). Gross *et al.* (1988) reporta al *L. mutabilis* como una especie de elevado contenido de oligosacáridos frente a las otras especies. Comparándolo con otras leguminosas, el *L. mutabilis* es muy superior inclusive que la soja misma.

Los oligosacáridos en el lupino europeo y americano (*L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. hispanicus*, *L. exaltatus*, *L. reflexus* y *L. mexicanus*) se presentan generalmente con un mayor contenido de Estaquiosa, seguido de la Verbascosa y finalmente la Rafinosa (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006; De la Cuadra *et al.*, 1994; Muzquiz *et al.*, 1999a; Ruiz *et al.*, 2000).

Se dispone de diversos métodos para minimizar el contenido de oligosacáridos y mantener la calidad del lupino, métodos como: fermentación, germinación, adición de enzimas, pelado, remojo y cocción (Doblado *et al.*, 2003; Khokhar *et al.*, 1996; Vidal-Valverde *et al.*, 1993a; Vidal-Valverde *et al.*, 1993b). Martínez-Villaluenga *et al.* (2006) reportan que aplicando el método de eliminación de oligosacáridos de Gulewicz *et al.* (2000) basado en germinación de semillas, extracción con etanol, precipitación y purificación se obtiene reducciones en el *L. luteus* de aproximadamente 12% de oligosacáridos hasta niveles de 0.7%, parámetros bajos que permiten incorporar al lupino en productos procesados.

2.6.2 ALCALOIDES TOTALES

Son un tipo de alcaloides encontrados en las leguminosas. En un estudio de *Lupinus mutabilis* de Huancayo Perú, Castillo (1979) reporta que los alcaloides están mayormente presentes en la semilla que la cáscara (2.77 y 0.26% respectivamente). Los alcaloides quinolizidínicos son llamados también alcaloides del lupino. Químicamente son sustancias nitrogenadas no proteicas conformados por anillos heterocíclicos de quinolizidina con inclusiones de 2 moléculas de nitrógeno en su composición básica y en algunos casos un hidroxilo añadido. Los alcaloides poseen propiedades alcalinas por las cuales deriva su nombre (Meneses *et al.*, 1996; Hatzold *et al.*, 1983; Cheeke y Kelly, 1989; Gross y Bunting, 1982) y son considerados los componentes anti-nutricionales más importantes en el lupino por la cantidad presente y sus efectos producidos. Son sustancias tóxicas de tal

peligro que puede ocasionar la muerte en su consumo elevado (Keeler y Gross, 1979; Briceño, 1979 citado por Santana, 1984). Por otro lado Gross y Bunting (1982) indican que los alcaloides debido a su amargor hacen indeseable sensorialmente al lupino. Desde los años 90, en algunos países europeos (Gran Bretaña, Francia, Australia y Nueva Zelanda) las autoridades de salud han decidido regular el contenido de alcaloides quinolizidínicos en harina de lupino y derivados dando como límite máximo 0.02% bh o 0.1% bs. (ANZFA, 2001; ACFNP, 1996; Bulletin, 1998). Los países europeos son más exigentes con respecto a niveles tóxicos, sin embargo en Sudamérica se amplía un poco más el límite permitido, según la Norma INEN 2390:2004 de Ecuador, el lupino es apto para consumo con niveles de hasta 0.07% (bh) o aprox. 0.2 % (bs).

Cuadro 12: Contenido de alcaloides de diferentes especies de lupino

Especie y variedad	Origen	Alcaloides Totales (%) bs
<i>L. mutabilis</i> ^a	-	3.1 - 3.3
<i>L. mutabilis</i> ⁱ cv. Dulce	PERÚ	0.163 - 0.607
<i>L. mutabilis</i> ⁱ cv. Amargo	PERÚ	1.33 - 4.54
<i>L. mutabilis</i> ^d	PERÚ	0.163 - 4.46
<i>L. mutabilis</i> ^f cv. Huancayo	PERÚ	3.3
<i>L. mutabilis</i> ^h cv. Huancayo	PERÚ	3.4
<i>L. mutabilis</i> ^g	ECUADOR	3.6
<i>L. albus</i> ^a	-	0.0 - 2.7
<i>L. albus</i> ^c cv. Ares	ALEMANIA	0.0146
<i>L. albus</i> ^c cv tip top	ALEMANIA	0.12
<i>L. albus</i> ^e	EGIPTO	1.47
<i>L. angustifolius</i> ^c cv. Boregine	ALEMANIA	0.11
<i>L. angustifolius</i> ^a	-	1.3 - 1.6
<i>L. luteus</i> ^a	-	0.4 - 1.3
<i>L. mexicanus</i> ^b	MEXICO	2.7
<i>L. exaltatus</i> ^b	MEXICO	2.1

FUENTE: a) Muzquiz *et al.* (1989); Muzquiz *et al.* (1994); b) Zamora *et al.* (2008b) y Ruiz *et al.* (2006); c) Resta *et al.* (2008); d) Repo-Carrasco (1988); e) Mostafa *et al.* (2013); f) Schoeneberger *et al.* (1981); g) Villacreces (2011); h) Sosa (2000); i) Gross y Bunting (1982).

Por comparación entre especies de lupino, el *L. mutabilis* alcanza a tener mayor contenido de alcaloides, generalmente alrededor del 3% (Ver Cuadro 12), y el *L. mutabilis* de origen

peruano puede llegar a presentar valores aun más altos (> 4%). En contraste se observa que los cultivos de Alemania son muy bajos del nivel permitido por normas, eso es porque son mejorados genéticamente (Resta *et al.*, 2008). Gross y Bunting (1982) en su estudio de 42 semillas de *Lupinus mutabilis* de Perú, los clasifican en dos grupos: (a) lupino con bajo contenido de alcaloides, dulce (hasta 1 %) y (b) lupino con elevado contenido de alcaloides, amargo (mayor de 1%).

2.7 DESAMARGADO DE LUPINO

La eliminación de alcaloides es el punto de partida cuando se trabaja con el lupino y todo procedimiento aplicado busca lograr el nivel permitido por las normas europeas y sudamericanas (0.1 y 0.2% bs respectivamente) (ANZFA, 2001; ACFNP, 1996; Bulletin, 1998; Norma INEN 2390:2004). Desde hace varios años, investigadores han logrado eliminar alcaloides por las siguientes técnicas: (a) Selección genética (Muñoz, 1979), (b) Desamargado y (c) Obtención de aislados proteicos (Repo-Carrasco, 1988). Sosa (2000) reporta que la eliminación de alcaloides produciendo aislado proteico presenta mayores ventajas nutritivas que por desamargado, sin embargo, este tipo de producto va mas direccionado al mercado empresarial, para venta como insumo tecno-funcional en el mejoramiento de productos procesados, no todos pueden tener acceso a dicha tecnología e insumos terminados por sus elevados costos. Por otro lado, la eliminación de alcaloides por mejoramiento genético es una técnica disponible solo para personas especializadas en el sector agrícola y las semillas genéticamente mejoradas no se encuentran en el mercado.

Conociendo que la mayor forma de consumo del lupino en Perú (zonas alto andinas y gastronomía) es la del lupino desamargado como semillas y harina (Chávez y Untied, 1979; Jacobson y Mujica, 2006), esto por su accesible procesamiento, bajo costo y presencia en el mercado; se puede afirmar que el desamargado resulta el método de eliminación de alcaloides más accesible tanto para el consumidor convencional y mercado empresarial. Si bien la técnica de desamargado acuoso no produce niveles de alcaloide ínfimos como el mejoramiento genético o aislados proteicos, Glorio (1990) revisa que el remanente que queda después del desamargado, niveles por debajo del 0.02% (bh), serían eliminados a través de la vía digestiva y urinaria, no observándose efectos nocivos. El método de desamargado es una técnica que se basa netamente en tres etapas básicas

(remojo, cocción y lavado). Sin embargo se tiene muchas metodologías que presentan variaciones en los parámetros de proceso (Ver Cuadro 13).

2.7.1 REMOJO

El remojo o hidratación es básicamente el contacto de la semilla con agua a temperatura ambiente por un tiempo determinado con la finalidad de acondicionar la semilla de lupino, como su nombre lo indica permite la hidratación de los tejidos del grano y así facilitar la salida de los alcaloides (FAO, 1982; Meneses *et al.*, 1996). El remojo se puede dar de dos maneras, en agua estacionaria o en agua de circulación. En el remojo de agua estacionaria se considera parámetros de control básicos: Relación materia prima: agua y tiempo. Algunos investigadores reportan, para el remojo diversas proporciones de materia prima: agua (1:2.5, 1:4, 1:5 y 1:6) y tiempos variables (0, 12, 18, 24 y 48 horas) (Ver Cuadro 12). Cuando se trabaja con remojo de agua circulante (metodo 8 del Cuadro 12), los parámetros son el caudal y el tiempo, sin embargo este tipo de hidratación no es muy utilizado por la poca viabilidad de su aplicación debido a que no es reproducible y es costosa su tecnología.

La cocción en definición es hervir el grano en cierta cantidad de agua por un tiempo determinado. Es la etapa clave en el proceso de desamargado del lupino donde se realizan muchas reacciones bioquímicas ventajosas como: destrucción del poder germinativo, enzimático y microbiano que causan descomposición del alimentos y desintegración de las células de alcaloides facilitando su extracción (FAO, 1982; Meneses *et al.*, 1996). Los parámetros de control básicos en la cocción son: relación materia prima: agua (mp:agua) y tiempo de cocción. Los tiempos de cocción aplicados son muy variables, se tienen registros desde 5, 30, 40, 45 y 50 min o tiempos mayores de 1hr, 1.5 hr y 2 hr (Ver Cuadro 12). Con respecto a la proporción mp: agua algunos autores la registran como 1: 2.5 o 1:3 (Jacobsen-Mujica, 2006; Mostafa *et al.*, 2013; Villacreces, 2011).

Otros autores reportan agregados a los parámetros básicos antes mencionados como adición de cal, agitación y dos cocciones. Sosa (2000) reporta que los métodos Tradicional, Cuzco y Cuzco modificado utilizan cal en la cocción (50 g de Cal por cada 10 kg de semilla) logrando contenidos mínimos de alcaloides (promedio 0.1% bs).

Cuadro 13: Comparación de algunos métodos de desamargado de lupino

METODO	Especie tratada	ETAPAS DE DESAMARGADO			FUENTE
		REMOJO	COCCION	LAVADO	
Tradicional (PERU).	<i>L. mutabilis</i> Hyo - Perú	18 hrs, mp: agua (1:5)	1 hr, En agua y cal (50 g cal /10 kg de semilla)	6 días, cambio de agua cada 6 hrs	Sosa (2000)
Tradicional (PERU)	<i>L. mutabilis</i> Puno - Perú	12 hrs, mp:agua (1:6)	1 hr cambio de agua cada 30 minutos Mp:agua (1:3)	agua circulante (rio) 2-3 días Agua reposo 5 días, mp: agua (1:3) , cambio cada 6 hrs	Jacobsen y Mujica (2006)
Tradicional (MEXICO)	Lupinus de México	-	1 hr	10 días, agua circulante (rio)	Alvarado (2006)
Egipcio	<i>L. mutabilis</i> Hyo - Perú	18 hrs, mp: agua (1:5)	30 min, solo agua	4 días, cambio de agua cada 6 hrs	Juarez, et al (1988)
Cuzco	<i>L. mutabilis</i> Hyo - Perú	18 hrs, mp: agua (1:5)	1 hr, agua y cal (50 g /10 kg de semilla)	1 día, cambio de agua cada 6 hrs	Tapia (1982)
Cuzco Modificado	<i>L. mutabilis</i> Hyo - Perú	-	30 min, agua y cal (50 g /10 kg de semilla)	12 hrs, cambio de agua cada 6 hrs	Sosa (2000)
Sistematizado Reactor Air Lift	-	40 min, mp: agua (1:4), P_v (1.36 atm) y P_a (0.2-0.4 atm)	45 min, en agua, agitación cte y descascarado de semilla cocida	13 hrs, agua en circulación (1.4 Lt/min), presión aire (0.2-0.4 atm), agitación cte.	Montes (1984)
Egipto	<i>L. albus</i> Egipto	12 hrs, agua circulación	1 hr, mp: agua (1:3)	2 días, cambio de agua cada 2 hrs	Mostafa <i>et al</i> (2013)
Cuzco	<i>L. mutabilis</i> Peru	-	1.5 hrs	3 días, agua en circulación	Schoeneberger <i>et al</i> (1981)
Tradicional	<i>L. mutabilis</i> Ecuador	18 hrs, mp: agua (1:2.5)	1 hr, mp: agua (1:2.5)	6 días, mp: agua (1:2.5), cambio de agua 3 veces por día (9, 13 y 16 hrs)	Villacreces (2011)
Tradicional	<i>L. mutabilis</i> Hyo - Perú	24 hrs, remojo	1 hr	5 días, cambios de agua sucesivos	Villaverde (2011)
Tradicional	<i>L. mutabilis</i> Ecuador	12 hrs	40 min	3 días	Berti <i>et al</i> (2013)
Tradicional	<i>L. albus</i> Grecia	-	2 hrs	10 días, cambio de agua cada 24 hrs	Tsaliki <i>et al.</i> (1999)
Tradicional	<i>L. mutabilis</i> Ecuador	12, 24 y 48 hrs, mp:agua (1:4)	30, 40 y 50 min Olla a presión	4, 6 y 8 días; mp:agua (1:2), c12h	Ortega Palacios (1995)
Tradicional	<i>L. albus</i> Mexico	No presenta, pero si descascarado	5 min	15 horas, agua circulante	Alvarado (2006)

2.7.2 COCCIÓN

Aunque el método tradicional no siempre utiliza cal (Jacobsen y Mujica; Alvarado, 2006), Tapia (1982) y Gross-Godomar (1982) señalan que la presencia Cal permeabiliza la cáscara y así se facilita la salida del alcaloide. Jiménez *et al* (1981), citado por Alvarado (2006) afirman que la adición de sales o ácidos mejora la salida de alcaloides y aumenta la pérdida de proteínas ya que las proteínas del *Lupinus* tienen un pI de 4.5 y a partir de allí aumenta su solubilidad y se pierde. Si la cal presenta ventajas sobre los alcaloides, se reporta también que los nutrientes como la proteína disminuyen por la adición de cal (Sosa, 2000). Aunque no hay estudios, se puede suponer que los demás nutrientes siguen el mismo perfil.

Con respecto a la agitación constante solo se aplica en el método sistematizado Reactor Air Lift. En los otros métodos se podría realizar agitación en forma periódica (Ver Cuadro 13). Finalmente referido a la partición de la cocción de 1 hora, en dos etapas de 30 minutos cada una, haciendo cambio de agua, es un agregado interesante sin embargo no se tiene estudio sobre su efecto sobre nutrientes y alcaloides del lupino.

2.7.3 LAVADO

Se llama lavado o extracción a la etapa final del proceso de desamargado del lupino, donde el grano cocido permanece en agua en reposo con cambios de agua periódica o en agua en circulación, por un determinado tiempo a temperatura ambiente. Según la FAO (1982) y Meneses *et al.*, (1996) en el lavado se completa la salida de alcaloides por solubilización durante el tiempo de su permanencia.

El lavado con agua en circulación se debería trabajar con control de caudal y tiempo, sin embargo, no hay un control respecto al caudal porque a veces es realizado en rios, o no es reportado en los estudios lo que no permite una reproducción del proceso. Respecto al tiempo, varía desde 15 horas, 3, 4 o 10 días (Ver Cuadro 13). Una extracción en sistema si permite el control del caudal, así como lo muestra el bioreactor Air Lift con un caudal de 1.4 Lt /min por 13 horas (Montes, 1984). Por otro lado en el lavado con agua de reposo los controles básicos son: proporción materia prima: agua, tiempo de cambio de agua y tiempo

total de lavado. El tiempo de lavado con cambio de agua es muy amplio y varía desde 12 hrs hasta (1-10 días) haciendo cambios de agua cada 2, 6 y 24 horas (Ver Cuadro 13). Jacobsen y Mujica (2006) y Villacreces (2011) reportan proporciones de materia: agua de 1:3 y 1:2.5 respectivamente.

2.8 EFECTO DEL PROCESO DE DESAMARGADO SOBRE NUTRIENTES Y FACTORES ANTINUTRICIONALES DEL LUPINO

Cuando se habla del efecto del desamargado sobre el lupino, se refiere a como las etapas del proceso influyen en el contenido nutricional y anti-nutritivo del lupino. Hay muchos reportes donde se considera dos componentes sustanciales de estudio: la proteína y los alcaloides, sin embargo, se tiene estudios que el desamargado también afecta otros componentes benéficos incrementándolos. Hay una constante búsqueda de optimización de métodos de desamargado para mejorar los efectos que éstos producen sobre el lupino. Se debe considerar también que el efecto que tenga un método sobre un determinado lupino no siempre va a ser el mismo para otro debido a las características propias de cada lupino.

Para el caso del *L. albus* con 1.47% de alcaloides Mostafa *et al* (2013) reportan que con el proceso de desamargado (**Remojo** de 12 hrs, agua circulación; **Cocción** de 1 hr y **Lavado** de 2 días con cambios de agua) se logra alcanzar mantener nivel nutritivo y minimizar alcaloides totales. Las proteínas y almidón se incrementan de 38.6 a 46.3% y de 1.98 a 4% respectivamente. Los autores argumentan que esto es posiblemente debido a la remoción de componentes solubles durante los cambios de agua (oligosacáridos, minerales, alcaloides, flavonoides y fibra), disminución de materia seca (89.19 a 66.46%) e incremento de agua en las semillas, asimismo una disminución de cenizas de 3.41 a 2.11%, infiriendo que esto es resultado de la disminución de fibra cruda y minerales durante el proceso de extracción. El contenido de extracto etéreo también disminuye pero no significativamente de 9.94 a 8.25% producto de la remoción del germen rico en lípidos junto con las cáscaras desprendidas. Referido a los ácidos grasos se reporta que el proceso de desamargado incrementa los ácidos grasos insaturados de 88.36 a 90.07% y disminuye en sus ácidos grasos saturados de 11.64 a 9.07%. Respecto a los insaturados esenciales se reporta incremento del Oleico de 43.82 a 46.11% y disminución del Linoleico de 32.19 a 28.4% y un incremento no significativa del Linolenico de 6.27 a 7.51%. Finalmente con

respecto al contenido de alcaloides totales se reporta una disminución de 1.47 a 0.03%, lo cual lo hace apto para el mercado a nivel internacional. Se podría asumir que el método es bueno por mantener el nivel nutritivo, pero se debe considerar que dicho método ha sido validado para dicha especie y sus características respectivas.

Si bien el *L. albus* puede presentar resultados nutritivos con desamargados no tan severos, el *L. mutabilis* requiere mayor proceso por su elevado contenido de alcaloides, sin embargo se debe tener más cuidado porque también los nutrientes son afectados.

Schoeneberger *et al* (1981) desamargan el *L. mutabilis* (3.3 % de alcaloides) de Perú eliminando la hidratación, pero agregando más tiempo de cocción y extracción (**Remojo** no efectuada; **Cocción** de 1.5 hr y **Lavado** de 3 días en agua en circulación) dando como resultado conservación de valor nutritivo y reducción de alcaloides. Reportan incremento de proteína de 41.4 a 55.9%, esto debido a la remoción de carbohidratos solubles en agua, incremento de extracto etéreo de 20.1 a 26.9% y disminución de carbohidratos 28.4 a 7.6%. Con respecto a los otros nutrientes se reporta disminuciones ligeras de fibra (de 6.5 a 7.1%) y ceniza (de 3.6 a 2.48%). El contenido de alcaloides se disminuye totalmente de 3.3 a menos de 0.02 %, lo que lo hace apto para consumo internacional. Respecto a la calidad proteica se reporta que el desamargado no la mejora con resultados de PER (1.53) y digestibilidad aparente de 81.2%. Finalmente hacen una comparación con valores de la soja comercial (43.5% de proteína, 18.9% de extracto etéreo, 4.6% de fibra, 5.5% de ceniza y 27.5% de carbohidratos) dando a conocer que el *Lupinus mutabilis* desamargado es aun mejor que la soja comercial. Este método conserva el valor nutritivo y reduce alcaloides del *Lupinus mutabilis* de Perú, el detalle es que no siempre se tiene acceso a extracción en agua en circulación, y lo que se busca es que un método sea totalmente reproducible.

En estudios de desamargado del *L. mutabilis* con 3.6 % de alcaloides procedente de Ecuador, Villacreces (2011) elimina por completo el agua de circulación (**Remojo** 18 hrs, **Cocción** 1hr y **Lavado** 6 días). Reporta un incremento significativo de proteína de 41.4 a 56% y fibra de 12.1 a 26.6% y señala que es por concentración. Por otro lado reporta disminución de extracto etéreo de 23.4 a 8.9%, señalando que es a causa de la lecitina, disminución de carbohidratos de 14.4 a 6.4% y disminución de ceniza de 5.1 a 1.9%.

También se reporta un ligero incremento de hierro de 5 a 6 mg /100 g y zinc de 3.6 a 3.8 mg/100 g. Nutritivamente el método afecta positivamente y también es apto para consumo en el mercado sudamericano ya que se reporta una disminución de alcaloides de 3.6 a 0.2%. Según la normalización INEN 2390:2004 de Ecuador (0.07 a 0.2% bs) este lupino es apto para consumo humano, es un parámetro no tan riguroso como el nivel permitido europeo pero si es bueno, además se reporta que en la planta donde se procesa dicho lupino sensorialmente es aceptado. De acuerdo a lo revisado el agua en circulación puede ser reemplazada por agua en reposo para un mejor control y reproducción del método.

En otro estudio de desamargado *L. mutabilis* procedente de Huancayo Perú, Villaverde (2011), le aplica más tiempo de hidratación y menos días de extracción que el reportado en el estudio ecuatoriano (**Remojo** 24 hrs en remojo; **Cocción** 1 hr y **Lavado** 5 días) encontrando que esto afecta negativamente a su contenido nutricional ya que provoca una disminución significativa de proteína de 47.21 a 20.63% y un incremento abrupto de carbohidratos de 23.13 a 50.86%. Con respecto a la extracto etéreo, fibra y ceniza reporta una disminución no significativa de 18.39 a 17.56% para lípidos, de 3.6 a 3.53% para ceniza y 7.57 a 7.42 % para fibra. No se registra un estudio de alcaloides, pero se puede asumir que disminuyó hasta los niveles permitidos. De esto se puede afirmar que un mayor tiempo de remojo afecta negativamente al contenido nutritivo del lupino.

De los dos últimos casos se observa gran influencia del tiempo de hidratación sobre el contenido nutricional. Ortega y Palacios (1995) también realizan un estudio comparativo de diferentes tiempos de hidratación, cocción y extracción para el *Lupinus mutabilis* amargo (>3 % alcaloides) de Ecuador (**Remojo**: 12, 24 y 48 horas, **Cocción** 30, 40 y 50 min a presión y **Lavado** 4, 6 y 8 días). Reportan que el tiempo de hidratación y tiempo de cocción influyen significativamente en la eliminación de alcaloides y disminución de proteínas, lo que no ocurre con el tiempo de extracción que no muestra influencia significativa. Considerando solo la hidratación, se registra que a tiempo de 12 horas el nivel de alcaloides es totalmente negativo variando de 0.81 a 2.61% con niveles de proteína de 37 a 41 %. A 24 horas el nivel de alcaloides aun es negativo variando de 0.15 a 1.12% con proteína de 35 a 38%. Y a 48 horas el nivel de alcaloides es positivo de 0 a 0.19% y proteínas de 33 a 36%. De esto se confirma nuevamente que a mayor tiempo de hidratación menor contenido proteico y la reducida salida de alcaloides puede ser debido a

la cocción a presión que de alguna manera pudo haber afectado el comportamiento de la semilla o el alcaloide.

Sosa (2000) hizo estudios enfocados a la cocción y extracción, le agrego cal y varió tiempos. Se reporta el efecto de 4 métodos de desamargado (Tradicional, Egipcio, Cuzco y Cuzco modificado) sobre el *Lupinus mutabilis* con 3.4 % de alcaloides de Huancayo, Perú. El método Tradicional (**Remojo** 18 hrs ; **Cocción** 1 hr, En agua y cal y **Lavado** 6 días) disminuye el contenido de proteína de 43.07 a 20.3% y una disminución de alcaloides de 3.39 a 0.03%. Totalmente aceptable a nivel alcaloides pero inaceptable a nivel nutritivo, esto debe estar directamente relacionado con la presencia de cal. El segundo método Egipcio elimina la cal y reduce el tiempo de cocción y extracción (**Remojo** 18 hrs; **Cocción** 30 min y **Lavado** 4 días) resultando disminución menor del contenido de proteínas de 43.07 a 29.08% y una disminución de alcaloides con un nivel aun consumible (de 3.39 a 0.19%). El tercer método Cuzco le adiciona otra vez cal y reduce el tiempo de extracción a mínimo (**Remojo** 18 hrs; **Cocción** 1 hr, agua y cal y **Lavado** 1 día) dando como resultado disminución mínima de proteína de 43.07 a 39.86% y disminución de alcaloides de 3.39 a 0.07%. Con esto se podría señalar cuando se utiliza cal la reducción de tiempo de extracción es mejor. El cuarto método Cuzco modificado elimina la hidratación y reduce tiempo de extracción (**Remojo** no efectuada; **Cocción** 30 min, agua y cal, **Lavado** 12 hrs) dando como resultado incremento de proteína de 43.07 a 63.80% y una disminución de alcaloides de 3.39 a 0.1%. El método Cuzco modificado no debería eliminar la hidratación tal vez el equilibrio proteína-alcaloide sea ideal.

Otros autores solo evalúan el desamargado del lupino sobre nutrientes sin considerar los alcaloides, lo cual no es correcto pero de todas maneras brinda información sobre el comportamiento de nutrientes del lupino. Alvarado (2006), descascara el *Lupinus albus* de México inicialmente, disminuye el tiempo de cocción (5 min) y realiza una extracción por 15 horas en agua circulante. Los resultados obtenidos son aprobados nutricionalmente, se reporta un incremento de proteína de 38.02 a 45.6% y extracto etéreo de 15.95 a 17.58% (bs) y una disminución de cenizas de 4.17 a 2.74%. Berti *et al* (2013) reporta que el *Lupinus mutabilis sweet* de Ecuador desamargado presenta mayor contenido de ácidos grasos insaturados y menor de saturados (**Remojo**: 12 horas, **Cocción** 40 min y **Lavado** 3 días). El *lupinus mutabilis* desamargado presenta 79.8% de ácidos grasos insaturados y

20.4% de ácidos grasos saturados; un contenido de ácido oleico de 47.5%, ácido linoleico de 2.8% y ácido linolénico 29.5%. Montatixe (2005) reporta que el desamargado del *L. mutabilis* de Ecuador incrementa su nivel de ácidos grasos insaturados (de 80.6 a 81.8%) y disminuye los saturados (de 20.1 a 18.6%). Con respecto a la actividad antioxidante, Tsaliki *et al.* (1999) reportan que el proceso de desamargado (**Remojo**: no aplicada, **Cocción** 2 horas y **Lavado** 10 días) disminuye la actividad antioxidante del *L. albus* de Grecia. En su reporte señalan que después del desamargado el contenido de polifenoles disminuye substancialmente, porque son solubles en agua y se eliminan en los lavados. Mostafa *et al.* (2013) reportan que el proceso de desamargado provoca disminución de los tocoferoles totales del *L. albus* (de 84.75 a 70.83 mg/100 g de extracto etéreo) por tanto disminución de su actividad antioxidante

Con respecto a otros factores anti-nutritivos, Kumar y D'Mello (1995) señalan que el abundante lavado en agua es el método que disminuye el contenido de saponinas, sin embargo la desventaja es que también en este proceso se reducen nutrientes hidrosolubles. Aguilera *et al.* (2009) reportaron que a través del lavado, cocción y deshidratación se reducen los niveles de oligosacáridos de las leguminosas. Por otro lado, aunque los inhibidores de tripsina se inactivan a altas temperaturas, se ha observado cierta resistencia debido a su rígida estructura y su alto contenido de enlaces disulfuro (Gueguen *et al.*, 1993). A pesar que las lectinas generalmente son más resistentes a desnaturalización térmica comparada con las demás proteínas de las plantas, una cocción prolongada las puede inactivar (Muzquiz *et al.*, 1999a). Gross y Bunting (1982) reportan que el tratamiento térmico aplicado en el desamargado a los *Lupinos mutabilis* de Cuzco y Huancayo elimina por completo su efecto aglutinante.

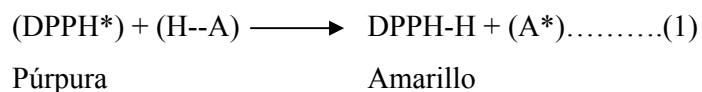
2.9 METODOS DE ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

En muchos casos es necesario realizar análisis cuantitativos rápidos y confiables de componentes de alimentos, que permita tomar decisiones en el momento, uno de estos métodos es el análisis espectrofotométrico. La espectrofotometría utiliza la relación de absorbancia y concentración para cuantificar la presencia de una especie absorbente. En el análisis cuantitativo por espectrofotometría, para obtener resultados confiables, es importante que la medición se realice a la longitud de onda de máxima absorbancia de la

sustancia que se está cuantificando, y estas mediciones deben estar dentro del rango de relación lineal de Absorbancia y concentración (Ley de Lambert - Beer). Se señala que para una longitud de onda constante y paso óptico fijo, una relación lineal entre Absorbancia y Concentración con pendiente que intercepta cero. Sin embargo esta ley sólo se cumple estrictamente o esta limitada para soluciones diluidas (concentraciones menores o iguales que $10^{-2}M$ y que den Abs en el rango de 0.2 a 0.8). A continuación se muestra el fundamento de análisis de cinco componentes (proteína soluble, actividad antioxidante, carbohidratos, oligosacáridos y alcaloides totales) por el método de espectrofotometría (Skoog, 2001).

2.9.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH

Para la determinación de actividad antioxidante por espectrofotometría existen dos métodos comunes, el método ABTS y el DPPH, pero de ellos el más utilizado es el DPPH, éste se fundamenta en que el electrón desapareado del radical DPPH (radical libre) se aparea con el electrón donador de un antioxidante, entonces el DPPH se reduce, dando como resultado decoloración del DPPH de color púrpura a amarillo, siendo su máxima absorbancia a 517 nm (Plank *et al.*, 2012).



A diferencia del método convencional de DPPH donde se adiciona el DPPH sobre un extracto de muestra el método planteado por Plank *et al* (2012) maximiza la eficiencia de extracción de antioxidantes por adición directa del estándar DPPH sobre la muestra. Los compuestos antioxidantes son continuamente extraídos de la muestra por el metanol HPLC y en simultaneo reaccionan con el DPPH hasta que la extracción y reacción sea completa (Plank *et al.*, 2012). Otro aspecto importante que presenta esta modificación del método DPPH es que a parte de la curva de trolox, utiliza una serie de ecuaciones para su determinación.

2.9.2 PROTEÍNA SOLUBLE POR BRADFORD

En general las proteínas de un alimento son cuantificadas como proteína cruda por el método de Kjeldahl, el cual es considerado como proteína total del producto. Kjeldahl es un método de basado en la cuantificación de nitrógeno, muy utilizado por su elevada precisión sin embargo cuando se trata de un gran número de muestras no es muy aplicable por tiempo y costo. Determinar proteínas por espectrofotometría da una referencia del contenido de proteínas de una muestra. Todas las proteínas son solubles a pH alcalinos, sin embargo no se puede afirmar que la proteína cruda es similar a la proteína soluble, porque los diferentes tipos de proteínas son solubles en diferentes tipos de solventes (Ej. Globulinas en cloruro de sodio o albuminas en agua) (Skoog, 2001), por tanto nunca se alcanzará a solubilizar el 100% de las proteínas, la espectrofotometría cuantifica parcialmente las proteínas, entonces determinar proteínas solubles sería muy útil para evaluar un perfil de pérdida de proteínas durante un proceso, evaluar gran cantidad de muestras, a bajo costo y en el menor tiempo posible. Existen dos métodos espectrofotométricos muy conocidos para determinar proteínas solubles (Lowry y Bradford), mas Bradford es más rápido y sensible que el de Lowry.

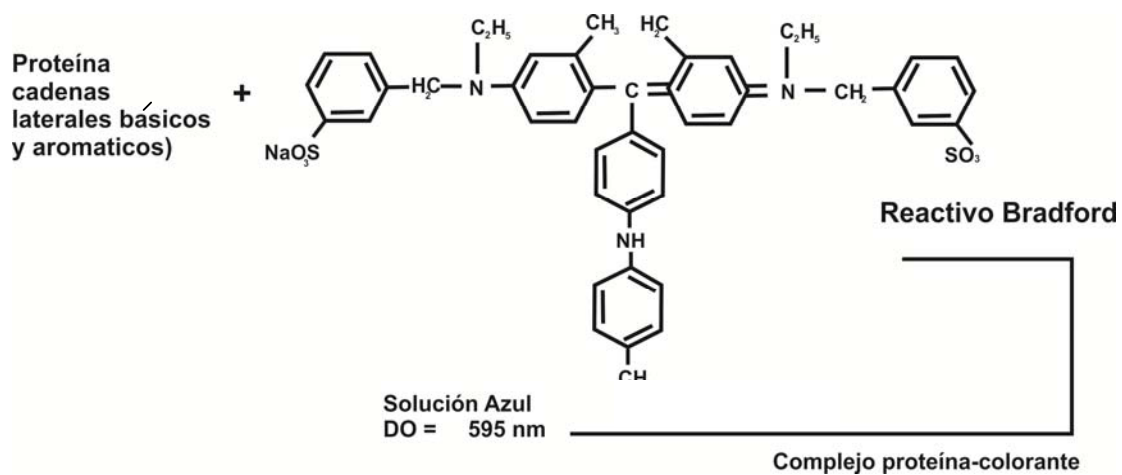


Figura 1: Esquema de complejo proteína-colorante Bradford

FUENTE: Skoog (2001)

Según Zaia *et al* (1998) el método de Bradford es una técnica para la determinación de proteínas solubles que utiliza el colorante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este

método está basado en la interacción entre el colorante BG-250 y las macromoléculas de proteína que contiene aminoácidos de cadenas laterales básicas o aromáticas. El colorante, en solución acida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción molar mayor que el colorante libre (Ver Figura 1). En medio ácido, la interacción entre la proteína de alto peso molecular y el colorante BG-250 provoca un rompimiento del equilibrio del colorante para la forma aniónica, que absorbe fuertemente a 595 nm.

Si bien se usa generalmente el espectrofotómetro UV para determinación proteica por Bradford, existe un equipo que maximiza la aplicabilidad del método tradicional; el lector de micropozos es un tipo de espectrofotómetro que tiene la ventaja de lectura de 96 muestras en simultáneo y reduciendo al mínimo el uso de reactivos.

2.9.3 CARBOHIDRATOS TOTALES Y OLIGOSACÁRIDOS POR FENOL ÁCIDO SULFÚRICO

En general los carbohidratos totales son determinados por diferencia del total de componentes (100%) y la suma de agua, proteína, extracto etéreo y ceniza. Determinar carbohidratos bajo este método depende mucho de la determinación de los otros componentes lo cual extiende demasiado el trabajo; una determinación por espectrofotometría reduce la determinación únicamente a carbohidratos desligándola completamente de los demás componentes como el método tradicional. Dentro de los carbohidratos, los oligosacáridos son importantes debido a que su presencia en leguminosas es perjudicial para la salud digestiva provocando disenterías, flatulencia, dolores abdominales, entre otros. La determinación de oligosacáridos generalmente es por medio de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) la cual es muy costosa, una determinación mediante espectrofotometría sería de mucha ayuda. Saha y Brewer (1994) reportan un trabajo de determinación de carbohidratos totales y oligosacáridos por el método espectrofotométrico fenol ácido sulfúrico. El fundamento fenol ácido sulfúrico es la destrucción de carbohidratos por la presencia de ácido (H_2SO_4) en medio caliente. Primero se da una deshidratación de azúcares y formación de varios derivados del furano. Esos productos luego son condensados gracias a los compuestos fenólicos (fenol,

resorcinol, orcinol entre otros) dando como resultado un color marrón; esto se mide en el espectrofotómetro a 490 nm (BeMiller, 2010).



Virtualmente toda clase de azúcares, incluyendo azúcares derivados, oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados con el método fenol ácido sulfúrico (BeMiller, 2010). Entonces, con el método fenol ácido sulfúrico basta una curva de glucosa para determinar el contenido de carbohidratos totales. Saha y Brewer (1994) reportan un estudio que permite determinar oligosacáridos en forma específica bajo el mismo método. Señalan que una curva de mezcla de dos hexosas (manosa y galactosa, 1:1) presentan similar perfil que un estándar de oligosacáridos a diferentes diluciones. En el estudio de leguminosas como el lupino es importante el estudio de oligosacáridos ya que son compuestos no ventajosos para el organismo.

2.9.4 ALCALOIDES TOTALES POR PÚRPURA BROMOCRESOL

Los alcaloides totales en general son cuantificados por titulación y también por HPLC (cuantificación de alcaloides individual). Sin embargo dichos métodos requieren mucho tiempo (titulación) y elevado costo (HPLC). Una cuantificación de alcaloides totales por espectrofotometría permite una cuantificación en corto tiempo, un gran número de muestras en simultáneo y bajo costo. Según Castillo (1979) y Sosa (2000) el método de alcaloides totales por púrpura bromocresol (BKP) se fundamenta en extracción de alcaloides con solvente orgánico en medio alcalino. Los alcaloides son separados (fraccionados) de componentes salinos de la muestra por la adición de solución de alcalina (KOH, 15%) y Al_2O_3 en polvo; luego, dichos alcaloides liberados son recuperados con un solvente orgánico (cloroformo) a temperatura ambiente. Dicha solución orgánica conteniendo los alcaloides entra en contacto con el colorante ácido BKP haciéndolo inestable y degradándolo (degradación por hidroxilación). La variación de color es cuantificado por espectrofotometría a 410 nm. A menor absorbancia mayor contenido de alcaloides. El colorante disminuye su color de naranja oscuro a amarillo pálido (variación de pH de 5.2 a 6.8) y ésta es una referencia de contenido de alcaloides.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El proceso de desamargado y análisis espectrofotométricos de los diez genotipos de lupino se llevaron a cabo en la planta piloto y en los laboratorios de Microbiología y Físicoquímica de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM, Lima); el análisis proximal en Laboratorios del Instituto de Desarrollo Agroindustrial INDDA (Lima).

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1 MATERIA PRIMA

Nueve genotipos de *L. mutabilis* y uno de *L. albus*, recolectados por el Programa de Granos, Leguminosas y Oleaginosas (PGLO) de la Universidad Nacional Agraria la Molina, de diferentes regiones del Perú: 1) La Libertad: *L. mutabilis* AAHO; 2) Ancash: *L. mutabilis* Altagracia Recuay, *L. mutabilis* Cholo Fuerte y *L. mutabilis* Vicos; 3) Junín-INIA: *L. mutabilis* H6, *L. mutabilis* Moteado Beige y *L. mutabilis* Compuesto Blanco Semiprecoz; 4) Cuzco-INIA: *L. mutabilis* Andenes; 5) Puno: *L. mutabilis* Yunguyo y 6) Lima-PGLO, UNALM: *L. albus* UA-2013. Ver Figura 2.

3.2.2 REACTIVOS

- Ácido sulfúrico concentrado (98.8%), MERCK
- Almidón de maíz (Maicena)
- Agua desionizada y destilada
- Bradford (Reactivo colorante), MERCK

- BSA (Proteína bovino sérico albumina, Polvo color blanco), SIGMA-ALDRICH



Figura 2: Genotipos de lupino (*L. mutabilis* y *L. albus*) para estudio de desamargado

- Cloruro de sodio (GR), MERCK
- Cloroformo (líquido concentrado), MERCK
- DPPH (Reactivo colorante), SIGMA-ALDRICH
- Etanol (99.9%), SIGMA-ALDRIC
- Fenol (GR, cristales), MERCK
- Galactosa y Glucosa anhidra (polvo), SCHARLAU
- Hidróxido de potasio (polvo), FERMONT
- Isopropanol (líquido concentrado), SIGMA-ALDRICH
- Manosa anhidra (polvo), SIGMA-ALDRICH
- Metanol grado HPLC, SIGMA-ALDRICH
- Óxido de Aluminio Básico (polvo), SIGMA-ALDRICH
- Purpura de Bromocresol BKP (polvo), MERCK
- Trolox (97% de pureza, antioxidante polvo), SIGMA-ALDRICH

3.2.3 MATERIALES

- Beacker de 100,
- Embudos de vidrio 10 cm de diámetro
- Fiolas de 10, 100, 250, 500, 1000
- Gradillas de tubos de vidrio y Falcom
- Micropipetas de 20:200 uL, 100:1000 uL
- Micropipeta multicanal (12 canales)
- Molinillo de café
- Placas de micropozos de 96 celdas
- Probeta de 10, 100, 500 mL
- Tips de micropipetas
- Tubos Ependorf de 1.5 mL de cap.
- Tubos Falcom de 50 mL de cap.
- Tubos de vidrio de 10 mL de cap.

3.2.4 EQUIPOS

- Agitador orbital (LAB. COMPANION SK-300)

- Balanza analítica (SARTORIUS)
- Balanza de precisión
- Calentador con agitador (IKA)
- Centrífuga de 15000 rpm con control de temperatura
- Detector de humedad infrarojo (OHAUS, MB 35, HALOGEN)
- Espectrofotómetro UV (GENESYS 20, 325 -110M)
- Lector de micropozos (BIOTEK)
- Rotavapor (RII-BUCHI)
- Secador de Bandejas
- Vortex

3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.3.1 HUMEDAD

Se determinó la humedad por el método gravimétrico descrito por AOAC 925.10 (2005).

3.3.2 CARBOHIDRATOS POR DIFERENCIA

Se determinó carbohidratos por diferencia MS-INN (Collazos, 1993).

3.3.3 PROTEÍNA CRUDA

Se determinó proteína cruda por el método Kjeldhal, AOAC 920.87 (2005)

3.3.4 EXTRACTO ETÉREO

Se determinó el extracto etéreo por el método Soxhlet, AOAC 922.06 (2005)

3.3.5 CENIZAS

Se determinó el contenido de cenizas por el método AOAC 923.03 (2005)

3.3.6 FIBRA CRUDA

Se determinó la fibra por el método descrito por la NTP 205.003 (1980)

3.3.7 MATERIA SECA

Se determinó el contenido de materia seca para grano sin desamargar mediante el método de materia seca general para alimentos (3) y para el grano desamargado considerando el peso inicial (4)

$$MS_{sd} = (100 - H_{sd}) \dots \dots \dots (3)$$

$$MS_d = \frac{w_2}{w_1} (100 - H_d) \dots \dots \dots (4)$$

Donde:

MS_{sd} es el porcentaje de materia seca de lupino sin desamargar; H_{sd} es la humedad de lupino sin desamargar;

MS_d es el porcentaje de materia seca de lupino desamargado; W_2 es peso de lupino desamargado humedo (kg); W_1 es peso de lupino sin desamargar seco (kg); H_d es el porcentaje de humedad de lupino desamargado humedo.

3.3.8 RENDIMIENTO EN GRANO SECO

Se determinó el rendimiento en grano seco mediante la siguiente ecuación 5. (Ver procedimiento en Anexo 08).

$$Rendimiento (\%) = \left(\frac{w_2}{w_1} \right) \times 100 \dots \dots \dots (5)$$

Donde: w_2 = Materia seca de lupino desamargado (%)
 w_1 = Materia seca de lupino sin desamargar (%)

3.3.9 COSTO DE DESAMARGADO DE LUPINO

El costo de agua se determinó de acuerdo a la equivalencia aplicada por SEDAPAL donde el m³ o 1000 Lt de agua equivale 2.7 soles (valor redondeado). Respecto al gas se consideró una equivalencia aproximada (90 horas de uso de gas en cocina es igual al costo de un balón genérico de 10 kg de la marca SOLGAS de 38.5 soles).

3.3.10 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la actividad antioxidante por método colorimétrico del DPPH en espectrofotómetro UV (Adaptación de Plank *et al.*, 2012). El método original, la forma de cálculo y los preliminares se reportan en el Anexo 02.

3.3.11 PROTEÍNA SOLUBLE

Se determinó la proteína soluble por método colorimétrico de Bradford en lector de micropozos (Adaptación de Bradford, 1976). El método original, la forma de cálculo y los preliminares se reportan en el Anexo 03.

3.3.12 CARBOHIDRATOS TOTALES Y OLIGOSACÁRIDOS

Se determinó oligosacáridos y carbohidratos totales por método colorimétrico de Fenol ácido sulfúrico en lector de micropozos (Adaptación de Saha y Brewer, 1996). El método original, la forma de cálculo y los preliminares se reportan en el Anexo 04.

3.3.13 ALCALOIDES TOTALES

Se determinó alcaloides totales por el método colorimétrico de púrpura bromocresol en espectrofotómetro UV con púrpura bromocresol (Baer, 1978, citado por Sosa, 2000). El método original, la forma de cálculo y los preliminares se reportan en el Anexo 05.

3.3.14 VALOR ENERGÉTICO

Se determinó el valor energético en kcal de acuerdo a los factores de conversión señalados por la FAO (2002). Siendo 4kcal/g de proteína cruda, 4kcal/g de carbohidratos totales y 9 kcal/g de extracto etéreo.

3.3.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la composición químico proximal de granos de lupino sin desamargar y desamargado (Carbohidratos, Cenizas, Proteína, Extracto etéreo y Fibra cruda) de los 10 genotipos de lupino (Altagracia (AL); H6 (H6); Andenes (AND); Moteado Beige (MB); Cholo Fuerte (CHF); Yunguyo (YY); Vicos (VI); Tarwi AAHO (AAHO); Compuesto Blanco semiprecoz (CBS) y el *L. albus* (ALBUS) fueron procesados mediante análisis ANOVA de un factor y prueba de Tukey, con 10 tratamientos (ALT, H6, AND, MB, CHF, YY, VI, AA, CBS Y LD) y dos repeticiones. Se utilizó el Software SPSS. V.20 (Ver esquema en Figura 4).

Los componentes determinados por espectrofotometría: Proteína soluble, Alcaloides Totales, Actividad Antioxidante, Carbohidratos Totales y Oligosacáridos de los 10 genotipos de lupino (sin desamargar y desamargado) fueron evaluados siguiendo el mismo procedimiento anterior. Cada tratamiento se realizó por duplicado y triplicado dependiendo del análisis. El valor energético de los diez genotipos de lupino fueron determinados siguiendo el mismo protocolo mencionado. Para la evaluación la precisión de los datos analíticos se determinó la desviación estandar típica y los intervalos de confianza al 95% para la barras de error según lo indicado por Nielsen (2010).

Se utilizó el valor $t = 12.7$ con 1 grado de libertad para los análisis duplicados y un valor $t = 3.4$ con 2 grados de libertad para los análisis por triplicado.

Los valores de intervalo de confianza según Nielsen (2010) es como sigue en la ecuación 6:

$$IC_{95\%} = t x \left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \dots \dots \dots (6)$$

Donde: IC 95% : Intervalo de confianza al 95%

t : valor obtenido según tabla de acuerdo a los grados de libertad (n-1)

σ : desviación estándar típica

n : número de repeticiones del análisis

3.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El esquema experimental seguido para determinar la influencia del genotipo de lupino en el aspecto tecnológico de desamargado acuoso a través de sus efectos en la composición nutricional y de inocuidad, se observa en la Figura 3.

3.4.1 MATERIA PRIMA

Las semillas secas de los diez genotipos de lupino fueron almacenadas en bolsas de papel codificadas del siguiente modo: *L. mutabilis* AAHO (AAHO), *L. mutabilis* Altagracia Recuay (ALT), *L. mutabilis* Cholo Fuerte (CHF), *L. mutabilis* Vicos (VI), *L. mutabilis* H6 (H6), *L. mutabilis* Moteado Beige (MB), *L. mutabilis* Compuesto Blanco Semiprecoz (CBS), *L. mutabilis* Andenes (AND), *L. mutabilis* Yunguyo (YY) y *L. albus* UA-2013 (ALBUS).

3.4.2 PROCESO DE DESAMARGADO

El desamargado se realizó adaptando el método planteado por Jacobsen y Mujica (2006), el cual siguió el siguiente flujo de operaciones (Figura 4). El método original, la forma de cálculo y los preliminares se reportan en el Anexo 01.

Pesado: Se pesó el grano de lupino sin desamargar para determinar la cantidad de agua a utilizar en el remojo.

Remojo: Para el remojo o hidratación la proporción de materia prima: agua fue de 1:6 (w/v). El tiempo de remojo fue 12 horas a temperatura ambiente. Se realizó en recipientes de plástico (baldes sin tapa). Se pesó el grano remojado.

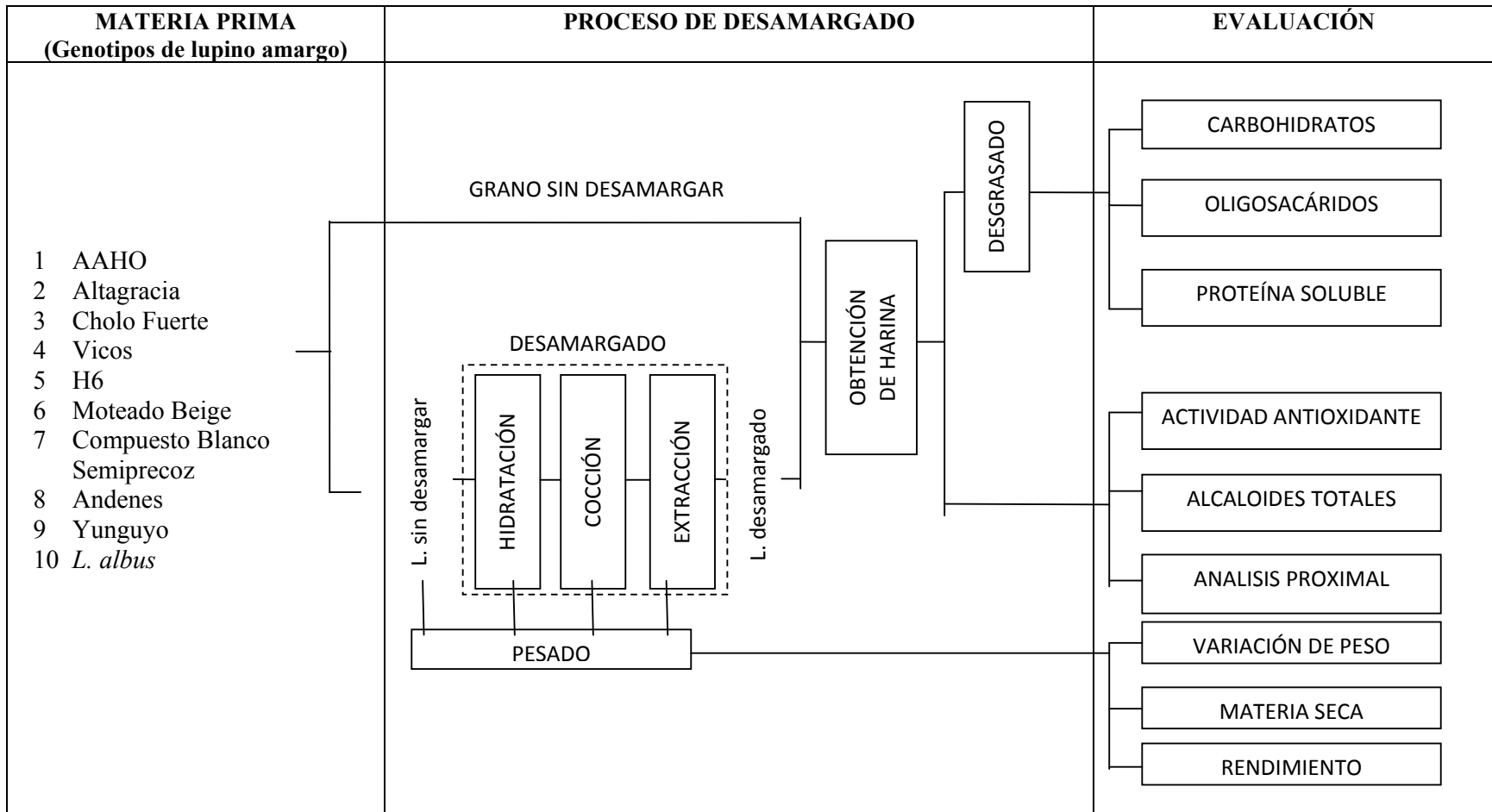


FIGURA 3: Esquema experimental para determinar la influencia del genotipo de lupino en el aspecto tecnológico de desamargado acuoso a través de sus efectos en la composición nutricional y de inocuidad.

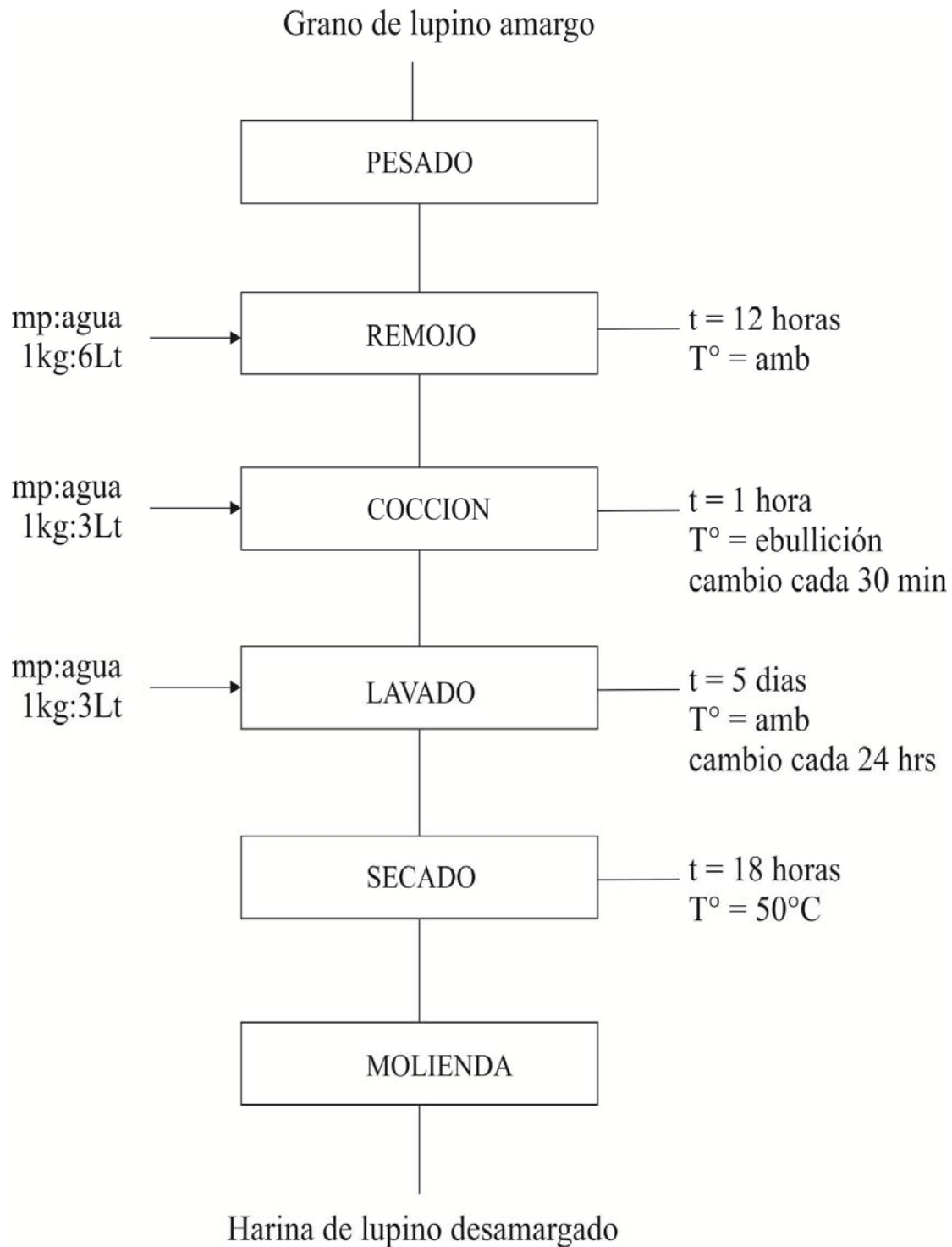


Figura 4: Proceso de obtención de harina de lupino desamargada

FUENTE: Adaptado de Jacobsen y Mujica (2006)

Cocción: La muestra remojada y escurrida se llevó a cocción 2 veces (cada una de 30 minutos) en la proporción de materia prima: agua 1:3 (w/v). El registro de tiempo de cocción empezaba al iniciar la ebullición) (Jacobsen y Mujica, 2006). Al término de cada cocción se escurrió el grano y se extrajo muestra para la evaluación de ganancia o pérdida de peso por genotipo.

Lavado: El lavado o extracción se realizó por reposo del grano en agua sin flujo en recipientes de plástico sin tapa (baldes de 20 Lt de capacidad) y agua potable. La proporción de grano: agua fue de 1:3 (w/v). El lavado se realizó por un tiempo de 5 días a temperatura ambiente. Cada 24 horas se realizó cambio de agua, manteniendo la misma proporción grano: agua. Al término de cada día de lavado, los granos fueron escurridos y pesados para la evaluación de ganancia o pérdida de peso por genotipo de tarwi. Se extrajo cierta cantidad de grano húmedo por genotipo para su análisis proximal.

Secado: El secado se realizó a temperatura de 50°C por 18 horas colocando los granos en mallas del secador de bandejas. La humedad del grano seco fue de en promedio aproximadamente 11%. Los granos secos fueron almacenados en bolsas de PE a temperatura ambiente hasta su molienda.

Molienda: Los granos secos fueron molidos en molino de grano de café y tamizados en tamiz N° 2 obteniendo así harina de lupino de grano desamargado.

Almacenado: Se empacó la harina desamargada en bolsas de polietileno con cierre hermético (tipo ziplock); fue etiquetado y almacenado a temperatura ambiente hasta el momento de su análisis.

3.4.3 EVALUACIÓN

Se evaluó los cambios producidos por el proceso de desmargado acuoso para los diez genotipos de lupino. Se analizó el incremento de peso de grano húmedo, disminución de materia seca, rendimiento en grano seco desamargado, cambios en los componentes nutricionales, variación de actividad antioxidante, proteína soluble, oligosacáridos, alcaloides totales y valor energético.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se muestra los resultados de variación de peso de grano húmedo, disminución de materia seca, variación de contenido proximal, disminución de actividad antioxidante y factores antinutricionales (oligosacáridos y alcaloides totales) de diez genotipos de lupino por el proceso de desamargado acuoso (nueve de *L. mutabilis* y uno de *L. albus*).

4.1 VARIACIÓN DE PESO DE GRANO HÚMEDO

El proceso de desamargado acuoso produjo un incremento de peso de grano húmedo de los diez genotipos; incrementos relativos alrededor de 150 % (CBS, AND, VI, YY), 130% (ALT, CHF, MB, AAHO), 110% (ALBUS) y 100% (H6). (Ver cuadro 14)

Cuadro 14: Variación de peso de grano húmedo de diez genotipos de lupino durante las etapas de desamargado (remojo, cocción y lavado)

Genotipo *	ORIGEN	Grano sin desamargar (kg)	Remojo (kg)	Cocción (kg)		Lavado (kg)				
			12 hrs	30 min	60 min	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5 **
AAHO	Libertad	1.4	3.2	3.2	3.1	3.4	3.4	3.3	3.3	3.3
ALT	Ancash	1.4	3.3	3.2	3.2	3.3	3.4	3.3	3.3	3.3
CHF	Ancash	1.4	3.2	3.2	3.2	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
VI	Ancash	1.4	3.4	3.4	3.3	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
H6	Junín	1.4	2.7	2.7	2.7	2.9	3.0	2.9	3.0	2.9
MB	Junín	1.4	3.2	3.2	3.2	3.2	3.3	3.3	3.3	3.3
CBS	Junín	1.4	3.1	3.3	3.3	3.6	3.6	3.5	3.5	3.5
AND	Cuzco	1.4	3.3	3.3	3.3	3.4	3.5	3.5	3.5	3.5
YY	Puno	1.4	3.6	3.6	3.6	3.8	3.7	3.7	3.8	3.7
ALBUS	Lima	1.4	2.7	2.9	2.9	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

*AAHO, ALT: Altagracia, CHF: Cholo Fuerte, VI: Vicos, H6, MB: Moteado Beige, CBS: Compuesto Blanco Semiprecoz, AND: Andenes, YY: Yunguyo, ALBUS: *L. albus*

**Grano desamargado

El incremento mas importante se dió en la etapa de remojo (12 horas), con incrementos en mas del 100%. Meneses *et al* (1996) señalan que el incremento de peso es debido a la capacidad de hidratación del grano. Según Cheftel (1989) la hidratación se da por medio de proteínas y almidón. La etapa de la cocción (1 hora) no produjo variación considerable de peso de grano húmedo. Se observó que los granos salían estrujados al término de la cocción como si se hubiera producido salida de agua. Este comportamiento físico puede estar asociado a la pérdida de agua por parte de las proteínas del cotiledón y transferido a los hidrocoloides presentes en la cáscara. Según Meneses *et al* (1996) en la etapa de la cocción se da la coagulación de proteínas lo que disminuye su capacidad de retención de agua. La etapa de lavado (5 días) produjo incremento menos del 10% para todos los genotipos salidos de cocción (Ver cuadro 14). Los granos estrujados volvieron a hincharse, esto puede ser debido a que las proteínas volvieron a su estado natural, permitiendo así una rehidratación del cotiledón. Finalmente, los genotipos desamargados que presentaron mayor peso húmedo final fueron el CBS, AND, VI y YY pudiendo ser aprovechados para su venta y/o consumo en estado fresco (Ver detalles en Anexo 09).

4.2 DISMINUCIÓN DE MATERIA SECA

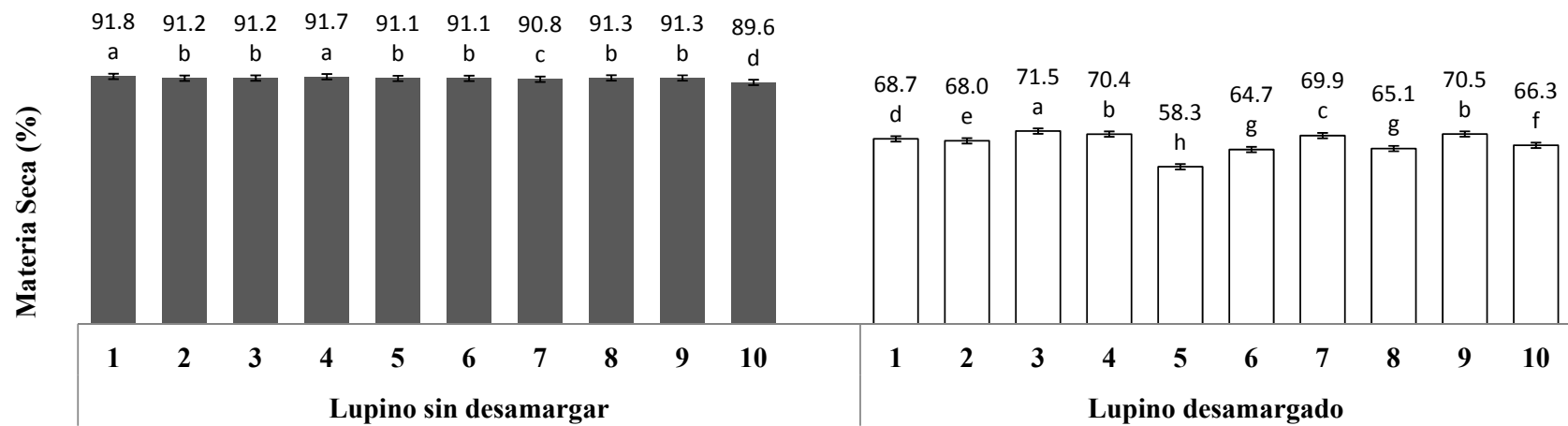
a) Lupino sin desamargar

La materia seca de los *L. mutabilis* sin desamargar reportaron un promedio de 91 % y para el *L. albus* sin desamargar un 90% de materia seca (Ver figura 5). Los resultados de materia seca estuvieron cerca de los datos obtenidos por Mostafa *et al* (2013) quienes muestran un contenido de materia seca 89.19 % para el *L. albus* sin desamargar.

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos de lupino disminuyeron su contenido de materia seca (Ver figura 5). Las disminuciones relativas fueron alrededor de 30% (H6) y 20% (CHF, YY, CBS, VI, AAHO, ALT, ALBUS, AND, MB). Los resultados fueron cercanos a lo reportado por Mostafa *et al* (2013) que muestran una disminución relativa de materia seca de 25% al desamargar *L. albus*. Los reportes indican que la pérdida de materia seca se da por pérdida de oligosacáridos, minerales, alcaloides, flavonoides y fibra durante

los lavados, Osborne (1907) muestra que es por pérdida de proteína soluble (albúminas) también en los lavados.



Media de materia seca \pm IC (intervalo de confianza) al 95% (n=2). Diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0.05$.

Figura 5: Materia seca de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

Villacreces (2011) agrega también que la disminución de materia seca se da por pérdida de extracto etéreo (fosfolípidos) como reporta en el lavado del *L. mutabilis*. Schoeneberger *et al* (1981) indican que se da por la remoción de carbohidratos solubles en agua. Se observa que el H6 presenta mayor pérdida de materia seca, pero no se sabe a que nivel de componente, lo mismo con los nueve genotipos restantes. Un análisis por componentes permitirá una mejor comprensión del presente resultado.

4.3 RENDIMIENTO DE GRANO SECO DESAMARGADO

En el caso de peso de grano húmedo, se observó incrementos en mas del 100% de su peso inicial, pero si se habla de pesos en grano seco, se reportó disminución, su materia seca disminuyó, por tanto, un rendimiento a nivel de grano seco fue menor del 100% (Ver cuadro 15).

Cuadro 15: Rendimiento en grano seco de diez genotipos de lupino desamargado

Genotipo*	Origen	Rendimiento (%)
AAHO	LIBERTAD	74.78
ALT	ANCASH	74.53
CHF	ANCASH	78.41
VI	ANCASH	76.78
H6	JUNÍN	64.02
MB	JUNÍN	71.01
CBS	JUNÍN	77.00
AND	CUZCO	71.27
YY	PUNO	77.22
ALBUS	LIMA	73.95

* AAHO, ALT: Altagracia, CHF: Cholo Fuerte, VI: Vicos, H6, MB: Moteado Beige, CBS: Compuesto Blanco Semiprecoz, AND: Andenes, YY: Yunguyo, ALBUS: *L. albus*

Bajo estas condiciones el rendimiento en grano seco de los diez genotipos de lupino fue alrededor de 70% (AAHO, ALT, CHF, VI, MB, CBS, AND, YY, ALBUS) y 60% (H6). (Ver Cuadro 15). Entonces se puede afirmar que nueve de los genotipos presentaron un mismo nivel de rendimiento a nivel de grano seco desamargado.

4.4 COSTO DE DESAMARGADO DE LUPINO

Del Cuadro 16 se observa que para desamargar 1 kg de lupino bajo el metodo tradicional aplicado se utiliza 0.6 soles. El presente resultado solo muestra dos aspectos del gasto incurrido en el desamargado tradicional: combustible (gas) e insumo básico (agua), debido a que la presente investigación no tiene como objetivo la producción del lupino, es a nivel laboratorio y referencial. Se sugiere realizar una anaálisis de todos los aspectos de materia prima, mano de obra y gastos indirectos para nivel planta.

Cuadro 16: Costo de uso de agua y gas para desamargar lupino

Detalle	Cantidad	Valor*
Agua	18 Lt	0.05
Gas	1 hr	0.5
TOTAL (s/.)		0.55

*Donde 1000 Lt de agua es 2.7 soles y 90 hr de gas 38.5 soles

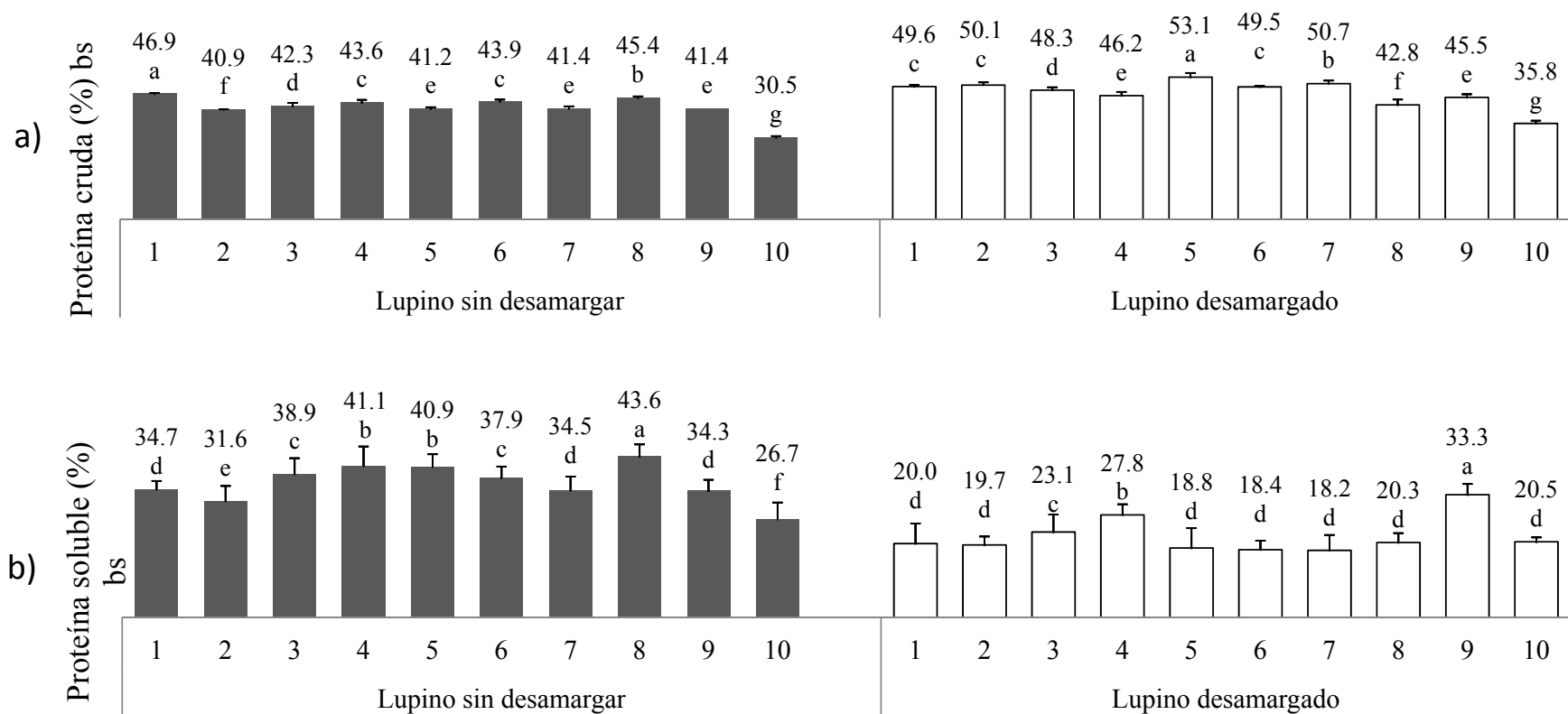
4.5 CAMBIOS EN LOS COMPONENTES DE VALOR NUTRICIONAL

4.5.1 PROTEÍNA

4.5.1.1 Proteína Cruda

a) Lupino sin desamargar

Los genotipos de *L. mutabilis* sin desamargar presentaron proteína cruda en un rango de 41 a 47%, todos superiores al genotipo *L. albus* que tuvo 31% (Ver Figura 6a). Se encontró que de los diez genotipos sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente (Ver ANVA y Tukey en Anexo 11). Los genotipos agrupados por su contenido de proteína cruda fueron alrededor de 40 % (AAHO, AND, ALT, H6, CBS, YY, CHF, VI y MB) y 30% (ALBUS).



Media de proteína (% bs) ± IC (intervalo de confianza) al 95% (n=2) de proteína cruda (a) y proteína soluble (b) de diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0.05$.

Figura 6: Proteína cruda y Proteína soluble de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

La similitud de proteína cruda de los *L. mutabilis* podría indicar que éstos a pesar de las diferentes condiciones de cultivo en que se encuentren, desarrollan similar nivel de proteína. Esto podría ser debido a su gran capacidad de adaptación y absorción de nitrógeno que presenta (Chavez y Untied, 1979; Gross, 1982; Jacobson y Mujica, 2006; ILC, 2005 citado por Ortega *et al.*, 2010; Neves, 1993).

Los resultados obtenidos estuvieron dentro de los rangos reportados en otras investigaciones, valores de 40 a 47% de proteína cruda para *L. mutabilis* y de 26 a 39% para *L. albus* sin desamargar (Gross 1982a; Groos y Baer, 1977; Villaverde, 2011; Sosa, 2000, Mostafa *et al.*, 2013; Alvarado, 2006; Sujak *et al.*, 2006). Frente a otras leguminosas los resultados de proteína cruda de los lupinos fueron superiores, las cuales presentan un rango de 23 a 27% y también al de la soja de 32 a 37% de proteína (Ministerio de Salud e Instituto de Salud, 2009).

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos de lupino presentaron valores de proteína cruda de 43 a 53% para *L. mutabilis* y un valor de 36% para el *L. albus* (Ver Figura 6a). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente (Ver ANVA y Tukey en Anexo 11).

El proceso de desamargado produjo incremento porcentual de proteína cruda, respecto a su contenido inicial para todos los genotipos, con excepción del genotipo AND que presentó disminución. Los incrementos relativos de proteína cruda se dieron alrededor de 20% (H6, ALT y CBS), 10% (YY, MB, CHF, ALBUS), menos de 10% (VI, AAHO) y una disminución inferior a 10% (AND).

Los reportes señalan que el aparente incremento proteico se da por disminución de materia seca (pérdida de carbohidratos solubles, oligosacáridos, minerales, alcaloides, flavonoides y fibra soluble). (Mostafa *et al.*, 2010; Schoeneberger *et al.*, 1981; Villacreces, 2011). Sosa (2000) reporta disminuciones e incrementos de proteína cruda después de desamargar el *L. mutabilis* procedente de Huancayo. Las disminuciones de proteína cruda de los genotipos se observa cuando el desamargado presenta largos tiempos de proceso y a

medida que va reduciendo tiempos, las disminuciones son menores y al final se da un punto de quiebre donde aparece el incremento porcentual.

Los incrementos porcentuales relativos de proteína cruda de los diez genotipos de lupino desamargados (de 6 hasta 29%) (Ver Figura 6a) están por debajo de los valores reportados en otras investigaciones. Schoeneberger *et al* (1981) reportan incremento porcentual relativo de proteína cruda de 37% después de desamargar el *L. mutabilis* de Perú. Villacreces (2011) reporta incremento porcentual relativo de 37%, después de desamargar el *L. mutabilis* de Ecuador. Sosa (2000) también reporta aumento porcentual relativo de 49% después de desamargar el *L. mutabilis* de Huancayo. Respecto al *L. albus* Mostafa *et al* (2013) reporta aumento porcentual relativo de 18% después de desamargar el *L. albus* de Egipto. Es posible que los reportes de otros autores presenten mayor incremento porcentual relativo de proteína cruda porque su proceso de desamargado fue menos tiempo. Sosa (2000) para obtener 49% de incremento, no realizó remojo, una cocción por 30 minutos y lavado 12 hrs; Schoeneberger *et al* (1981) obtiene un incremento de 37% porque no realiza remojo, cocción de 1.5 horas y solo 3 días de lavado.

Finalmente se podría señalar que los genotipos desamargados que presentaron mayores valores finales de proteína cruda fueron el ALT, H6 y CBS, considerando que éstos genotipos presentaron menor contenido de proteína cruda inicial (41%) que el resto de genotipos, pero dentro de los rangos de otros estudios y el desamargado acuoso les ocasionó mayores incrementos relativos (20%) logrando proteína cruda alrededor de 50% en el grano final. Por otro lado el ALBUS no sería aprovechable a nivel de proteína cruda, desde su grano inicial presentó menos proteína cruda (30%) que todos los genotipos y el desamargado solo le incrementó en su 10%.

4.5.1.2 Proteína soluble

a) Lupino sin desamargar

Los genotipos de *L. mutabilis* sin desamargar presentaron un rango de proteína soluble de 32 a 44% y todos superiores al *L. albus* que presentó un valor de 27% (Ver Figura 6b). Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren

estadísticamente (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13). Los genotipos agrupados por su contenido de proteína soluble fueron: 40% (H6, VI, AND); 30% (ALT, YY, CBS, AAHO, MB, CHF) y 20% (ALBUS).

Todos los valores de proteína soluble fueron inferiores a los valores de proteína cruda para todos los genotipos sin desamargar (Ver Figura 6). La superioridad cuantitativa observada de proteína cruda frente a proteína soluble de los lupinos sin desamargar se podría decir que es debido a: 1) La cuantificación de proteína soluble por Bradford se limita a un cierto tipo de proteínas solubles en soluciones salinas de baja molaridad (Ej. Globulinas y albuminas) (Skoog, 2001), mientras que la proteína cruda cuantifica todas las proteínas (prolaminas, gliadinas, globulinas y albuminas); 2) la proteína soluble cuantifica la proteína sin hidrolizar por reacción con el reactivo Bradford (Bradford, 1976) mientras que la proteína cruda cuantifica nitrógeno presente tanto de proteínas y alcaloides.

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos de lupino presentaron valores de proteína soluble de 18 a 33% para *L. mutabilis* y un valor de 21% para el *L. albus* (Ver Figura 6b). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en proteína soluble (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13).

El proceso de desamargado produjo disminución porcentual de proteína soluble de los diez genotipos de lupino. Las disminuciones relativas de proteína soluble se dieron alrededor de 50% (H6, AND, MB), 40% (CBS, AAHO, CHF), 30% (ALT, VI), 20% (ALBUS) y menos de 10% (YY). Según Skoog (2001) los lupinos presentan principalmente las fracciones proteicas globulinas y albuminas, solubles en soluciones salinas y acuosas respectivamente.

Entonces, es posible que la disminución de proteína soluble se dio a nivel de pérdida de proteínas albúminas que son solubles en agua, en la investigación el agua de lavado. Osborne (1907) corrobora que la albúmina de los lupinos se pierde en el lavado. Mostafa *et al* (2013) argumenta que la remoción de componentes solubles del lupino durante el desamargado se da en el lavado en los cambios de agua.

4.5.2 CARBOHIDRATOS

4.5.2.1 Carbohidratos por diferencia (CDF)

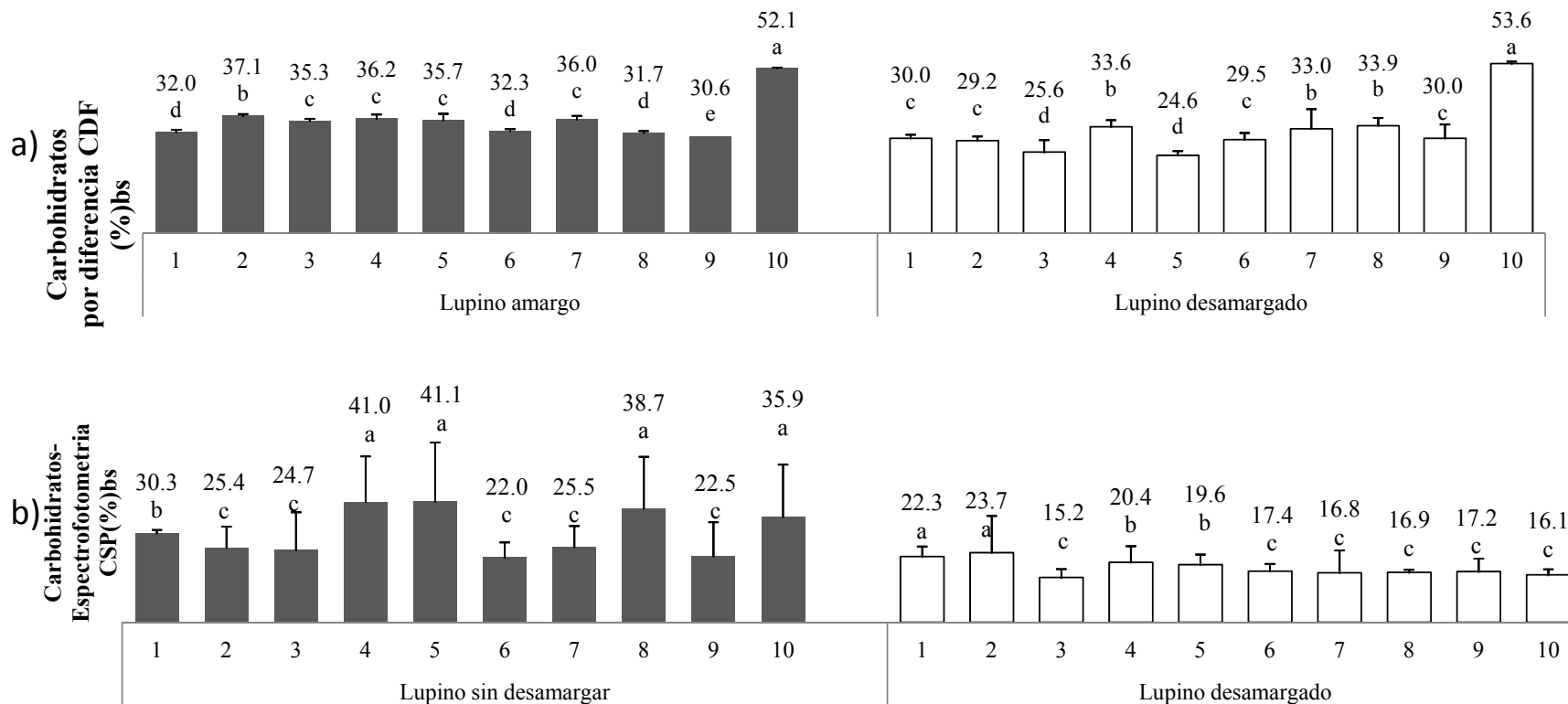
a) Lupino sin desamargar

Los genotipos de *L. mutabilis* sin desamargar presentaron similar contenido de CDF en un rango de 31 a 37% y todos inferiores al *L. albus* que tuvo un valor de 52% (Ver Figura 7a). Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de CDF (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11). Los genotipos agrupados por su contenido de CDF fueron 50% (ALBUS) y 30% (ALT, VI, CBS, H6, CHF, MB, AAHO, AND, YY).

De la Figura 7a, los genotipos de *L. mutabilis* sin desamargar superan en poco en contenido de CDF a lo reportado por otros autores con 27 a 32% para otros *L. mutabilis* sin desamargar, similar a los valores reportados para la soja (28 a 40%) y mucho menor frente a las leguminosas con 60% (Gross, 1982a; Sosa, 2000; Schoneberger *et al.*, 1981; Ministerio de Salud e Instituto de salud, 2009; Jacobsen y Mujica, 2006; Morón, 2005). Respecto al contenido de CDF encontrado para *L. albus* sin desamargar, este valor presentó un valor de carbohidratos (52%) superior a otros reportes que muestran de 34 a 38% (Gross, 1982a; Sujak *et al.*, 2006).

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos de lupino presentaron valores de CDF de 25 a 34% para *L. mutabilis* y un valor de 54% para el *L. albus* (Ver Figura 7a). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de CDF (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11). El proceso de desamargado produjo disminución e incremento de CDF de los genotipos. Las disminuciones relativas se dieron para 8 genotipos, alrededor de 30% (H6), 20% (CHF, ALT) y menos de 10%(YY, AAHO, VI, CBS, MB). Los incrementos relativos se dieron para dos genotipos, en menos de 10% (AND, ALBUS).



Media de Carbohidratos (% bs) \pm IC (intervalo de confianza) al 95% (n=2 para diferencia y n=3 para espectrofotometría) de carbohidratos por diferencia (a) y carbohidratos por espectrofotometría (b) de diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0.05$.

Figura 7: Carbohidratos CSP Y CDF de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

La disminución porcentual relativa de CDF reportada es mucho menor a los reportes por otros autores. Schoeneberger *et al* (1981) muestran una disminución porcentual relativa de 73% de CDF después de desamargar el *L. mutabilis* de Perú. Villacreces (2011) reporta una disminución relativa de 55% después de desamargar el *L. mutabilis* de Ecuador. Referido a los genotipos que aumentaron su contenido de carbohidratos (<10%), es mínima comparado con lo reportado por Villaverde (2011) que presenta un incremento de CDF de más del 100% al desamargar *L. mutabilis* de Huancayo.

Finalmente se podría señalar que los genotipos desamargados que presentaron mayores valores finales de CDF fueron el VI, CBS, MB, AAHO, YY y ALBUS, considerando que los genotipos mutabilis (VI, CBS, MB, AAHO, YY) presentaron valores similares de CDF inicial (30%) que el resto de genotipos, valores dentro de los rangos por otros estudios y el desamargado acuoso le ocasionó menores disminuciones (menos de 10%) obteniendo CDF final similares al grano inicial. El ALBUS presentó mayor contenido de CDF que todos los genotipos (50%) y el desamargado incrementa aunque en un nivel bajo manteniendo su valor de 50%.

4.5.2.2 Carbohidratos por espectrofotometría (CSP)

a) Lupino sin desamargar

El contenido de carbohidratos determinados por espectrofotometría (CSP) de los genotipos *L. mutabilis* sin desamargar estuvo en un rango de 22 a 41 % y para el *L. albus*, 36% (Ver Figura 7b). Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de CSP (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13). Los genotipos agrupados por su contenido de CSP fueron 40% (VI, H6), 30% (AAHO, ALBUS, AND) y 20% (MB, YY, CHF, ALT, CBS).

El contenido de CSP de los genotipos en estudio estuvieron cerca del rango obtenido por diferencia de 31 a 37% y también a los reportes de otros autores, con valores de 27 a 32% (Gross, 1982a; Sosa, 2000; Schoneberger *et al.*, 1981; Jacobsen y Mujica, 2006; Morón, 2005). Para el *L. albus* la cantidad de CSP (36%) fue menor respecto a lo determinado por diferencia (52%) pero dentro de los datos reportados por otros autores para el *L. albus*, 34 a

38% (Gross, 1982a; Sujac *et al.*, 2006). BeMiller (2010) reporta que el método espectrofotométrico reporta solo en base al contenido de glucosa. El método por diferencia pudo ser mayor porque abarca mayor número de componentes presentes en la diferencia del total de componentes con el contenido de agua, proteína, extracto etéreo y ceniza. Los CDF incluyen fibra, azúcares, oligosacáridos y polisacáridos (Fennema, 2010); mientras que los CSP incluyen solo carbohidratos hidrolizados a monosacáridos (BeMiller, 2010).

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos de lupino presentaron valores de CSP de 15 a 24% para *L. mutabilis* y un valor de 16% para el *L. albus* (Ver Figura 7b). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de CSP (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13). Los genotipos de *L. mutabilis* desamargados presentaron valores de CSP de 15 a 24% menores a los valores de CDF (25 a 34%); y para el ALBUS desamargado el mismo perfil inferior (CSP es 16% y CDF es 54%). El proceso de desamargado produjo disminución de CSP de los genotipos. Las disminuciones relativas se dieron alrededor de 50% (VI, H6, ALBUS, AND), 30% (CBS, CHF), 20% (MB, YY, AAHO) y menos de 10% (ALT). La pérdida de carbohidratos por el proceso de desamargado aplicado en este estudio, es inferior a las pérdidas reportadas por otros autores de 55 y 70% (Schoeneberger *et al.*, 1981; Villacreces, 2011). Lo que indica que el proceso de desamargado, utilizado aquí, no fue tan agresivo para eliminar drásticamente carbohidratos solubles ventajosos (fibra soluble como pectina, gomas, azúcares simples entre otros), pero que permitiría contribuir a la eliminación de carbohidratos no deseados como los oligosacáridos.

4.5.3 FIBRA CRUDA

a) Lupino sin desamargar

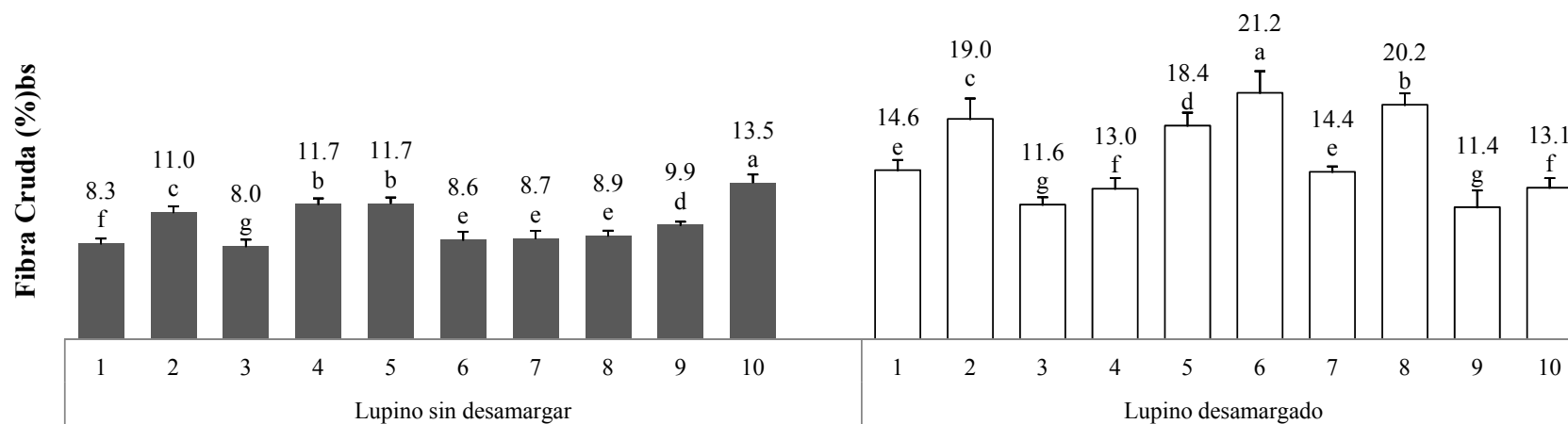
El contenido de fibra cruda de los *L. mutabilis* sin desamargar estuvo en un rango de 8 a 12% y del *L. albus* en 14% (Ver Figura 8). Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de fibra cruda (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11). Los genotipos agrupados por su contenido de Fibra

cruda fueron alrededor de 10% (ALT, VI, H6, ALBUS) y menos de 10% (CHF, AAHO, MB, CBS, AND, YY).

Los resultados fueron cercanos a otros reportes que muestran de 3 a 8% de fibra para el *L. mutabilis* y de 10% para el *L. albus* (Ortega et al., 2010; Gross, 1982a; Gross y Baer, 1977; Schoeneberger *et al.*, 1981; Sosa, 2000; Ministerio de Salud e Instituto de salud, 2009; Jacobsen y Mujica, 2006).

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos de lupino presentaron valores de fibra cruda de 11 a 21% para *L. mutabilis* y un valor de 13% para el *L. albus* (Ver Figura 8). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de fibra cruda (Ver ANOVA y Tukey en 11). El proceso de desamargado produjo incremento de fibra cruda de los genotipos *L. mutabilis*. Los incrementos relativos se dieron alrededor de 100% (AND, MB), 70% (ALT, AAHO), 60% (CBS), 50% (H6), 40% (CHF), 10% (VI, YY) y menos de 10% (ALBUS). El incremento de fibra cruda del tarwi es validado por Villacreces (2011) quien reportó un incremento porcentual de fibra de 120 % después del proceso de desamargado del *L. mutabilis* indicando que es por la concentración producida. Al parecer el desamargado solo provoca un incremento porcentual de fibra cruda de los genotipos *L. mutabilis* y no del *L. albus*, de esto se podría señalar que los *L. mutabilis* poseen mayor fibra soluble (pectina, gomas y mucilagos) que la insoluble, los que se pierden en los lavados, la materia seca disminuye por tanto su valor de fibra cruda aumenta porcentualmente. Por otro lado la mantención de fibra cruda del *L. albus* puede ser porque este tenga más fibra insoluble (hemicelulosa, celulosa y lignina) que la soluble. Finalmente se podría señalar que los genotipos desamargados que presentaron mayores valores de fibra cruda fueron el AND, MB y ALBUS, considerando que los genotipos *mutabilis* (AND, MB) presentaron menor contenido inicial de fibra cruda (menos de 10%) y el desamargado acuoso les ocasionó mayores incrementos (mas del 100%) obteniendo fibra cruda final superior a los valores de otros estudios, en un rango de 11-21%. El ALBUS por su parte presentó mayor contenido de fibra cruda inicial (14%) que los otros genotipos y el desamargado le ocasionó disminución pero aun asi superior a los rangos por otros estudios.



Media de fibra cruda (% bs) \pm IC (intervalo de confianza) al 95% (n=2). Diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0.05$.

Figura 8: Fibra cruda de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

4.5.4 EXTRACTO ETÉREO

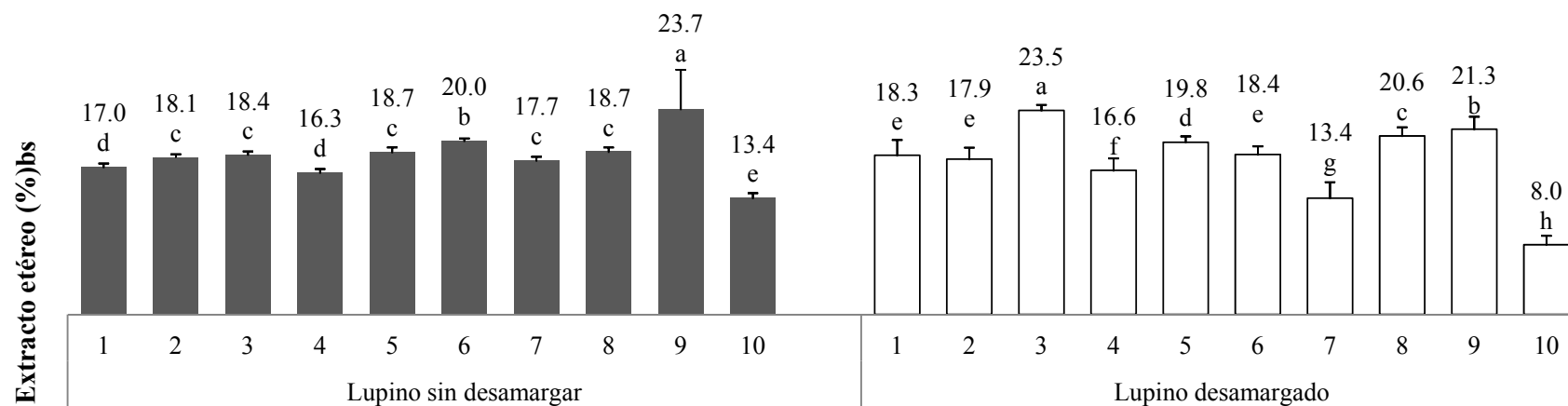
a) Lupino sin desamargar

El contenido de extracto etéreo de los *L. mutabilis* sin desamargar estuvo en un rango de 16 a 24% y para el *L. albus* 13 % (Ver Figura 9). Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de extracto etéreo (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11). Los genotipos agrupados por su contenido de extracto etéreo fueron 20% (MB, YY) y 10% (ALBUS, VI, AAHO, CBS, ALT, CHF, H6, AND). Al comparar los valores reportados, éstos fueron cercanos a los rangos reportados por otros autores para el *L. mutabilis* de 16.5 a 32.6%, y comparado a la soja que tiene de 16 a 21% de extracto etéreo (Gross, 1982a; Kay, 1985; Aguilera-Trier, 1978; Gross y Baer, 1977; Schoeneberger *et al.*, 1981; Sosa, 2000; Ministerio de Salud e Instituto de salud, 2009; Jacobsen y Mujica, 2006).

El extracto etéreo del *L. albus* (13%) no difiere mucho por lo reportado por Gross (1982a) con un rango de 9 a 11%. La superioridad en contenido de extracto etéreo de los *L. mutabilis* frente al *L. albus* es consistente con los reportes que señalan que el *L. mutabilis* supera al *L. albus* (Gross, 1982a; Kay, 1985; Aguilera-Trier, 1978; Gross-Baer, 1977; Schoeneberger *et al.*, 1981; Sosa, 2000). Puede que el *L. mutabilis* posea mayor cantidad de extracto etéreo que el *L. albus* pero según los reportes el *L. albus* es de mayor calidad, porque contiene mayor contenido de ácidos grasos insaturados que el *mutabilis* (88% y 80% respectivamente) y mayor contenido de Omega 3, 6 y 9 (Anchorena, 1999; Jacobsen y Mujica, 2006; Castillo, 1999; Mostafa *et al.*, 2013). Sería recomendable realizar un estudio de ácidos grasos para confirmar dichos reportes.

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos de lupino presentaron valores de extracto etéreo de 13 a 24% para *L. mutabilis* y un valor de 8% para el *L. albus* (Ver Figura 9). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de extracto etéreo (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11).



Media de extracto etéreo (% bs) \pm IC (intervalo de confianza) al 95% (n=2). Diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altigracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha= 0.05$.

Figura 9: Extracto etéreo de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

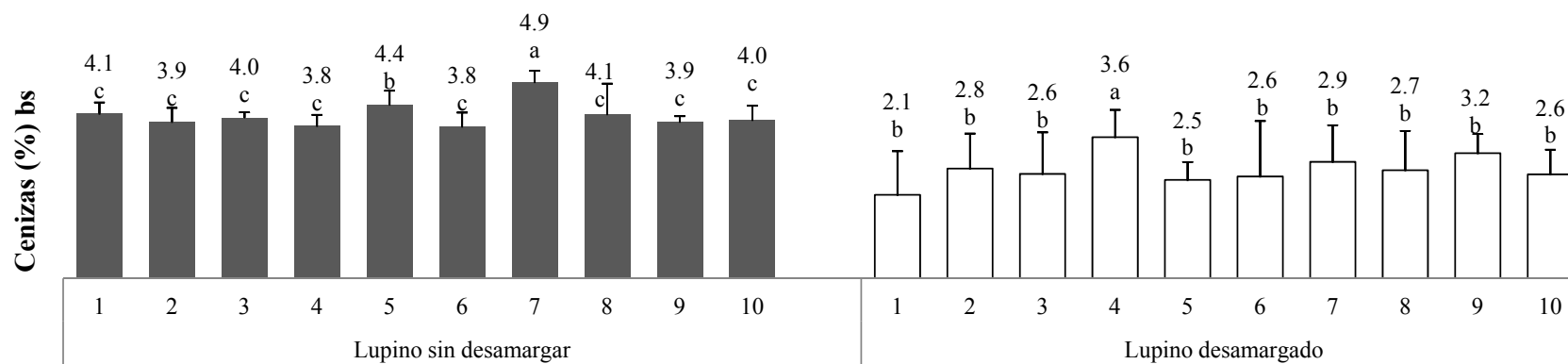
Entre los genotipos de *L. mutabilis* desamargados se observó algunos disminuyeron y otros aumentaron en contenido de extracto etéreo. Los incrementos relativos fueron alrededor de: 20% (CHF) y menor o igual a 10% (AAHO, AND, H6 y ALT). Las disminuciones relativas fueron alrededor de 40% (ALBUS), 20% (CBS) y menos de 10% (YY, MB y VI). Los resultados encontrados son similares a los reportes de otros estudios. Villaverde (2011) reporta constancia de extracto etéreo después del desamargado del *L. mutabilis* de Perú, manteniéndose en 18%. Mostafa *et al* (2013) reportan una pérdida porcentual relativa de extracto etéreo en 17% después del desamargado de *L. albus* de Egipto. La disminución porcentual de extracto etéreo en el *L. albus* podría ser causado por una pérdida de fosfolípidos presentes (Villacreces, 2011; Tsaliki *et al.*, 1999). Los fosfolípidos presentan una parte polar y otra no polar lo que permite esta solubilidad en agua (Fennema, 2010). Por su parte la posible causa de incrementos de extracto etéreo es por la pérdida de materia seca.

Finalmente se podría señalar que los genotipos desamargados que presentaron mayores valores de extracto etéreo fueron el YY, MB y CHF, considerando que el YY y MB presentaron mayor contenido inicial de extracto etéreo (20-30%) y el desamargado acuoso les ocasionó disminución mínima (menos de 10%) obteniendo extracto etéreo final (18-21%), dentro del rango de valores de otros estudios. El CHF por su parte presentó menor contenido de extracto etéreo inicial (18.4%) de los otros genotipos y el desamargado le ocasionó mayor incremento que todos los genotipos (mayor de 20%) dando como resultado contenido de extracto etéreo (24%) dentro de los rangos dados por otros autores. Por otra parte el ALBUS presentó el menor valor inicial de extracto etéreo que todos los genotipos (13%) y el desamargado acuoso le ocasionó la mayor pérdida que todos (40%), dando como resultado un valor (8%) por debajo del rango para *L. albus* dado por otros autores.

4.5.5 CENIZAS

a) Lupino sin desamargar

El contenido de ceniza de los *L. mutabilis* sin desamargar estuvo en un rango de 4 a 5% y el *L. albus* con 4% (Ver Figura 10).



Media de cenizas (% bs) \pm IC (intervalo de confianza) al 95% (n=2). Diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0.05$.

Figura 10: Cenizas de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de ceniza (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11). El genotipo que presentó mayor ceniza fue el CBS con 5% de ceniza y el resto un valor de 4%.

Los valores determinados están dentro de los rangos reportados por otros autores para el *L. mutabilis* de 3 a 4 % y también semejante respecto a la soja de 5 a 6 %. (Gross, 1982a; Gross y Baer, 1977; Jacobsen y Mujica, 2006). Respecto al *L. albus* el resultado no difiere mucho por lo reportado por Gross (1982a) que reporta 4 % y Sujak *et al* (2006) de 9 a 11% en valor promedio respectivamente de minerales para el *L. albus*.

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos de lupino presentaron valores de ceniza de 3 a 4% para *L. mutabilis* y un valor de 3% para el *L. albus* (Ver Figura 10).

Se encontró que de los diez genotipos desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de ceniza (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11).

El proceso de desamargado produjo disminución de ceniza de los genotipos. Las disminuciones relativas fueron alrededor de 40% (CBS, H6, AAHO), 30% (ALT, MB, AND, ALBUS, CHF), 20% (YY) y menos de 10% (VI). Los valores mostrados están dentro de lo reportado por otros autores que muestran disminuciones relativas desde 31%, hasta 60 % (Mostafa *et al.*, 2013; Schoeneberger *et al.*, 1981; Villacreces, 2011; Alvarado, 2006).

Según Mostafa *et al* (2013) la disminución de cenizas es debido a la pérdida de minerales durante el proceso de extracción (lavado) del proceso de desamargado. Finalmente se podría señalar que el genotipo desamargado que presentó mayor valor de cenizas fue el VI (Vicos), considerando que tuvo contenido de ceniza inicial similar que todos los genotipos (3-4%) y el desamargado le ocasionó menor disminución. (menos de 10%).

4.6 CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

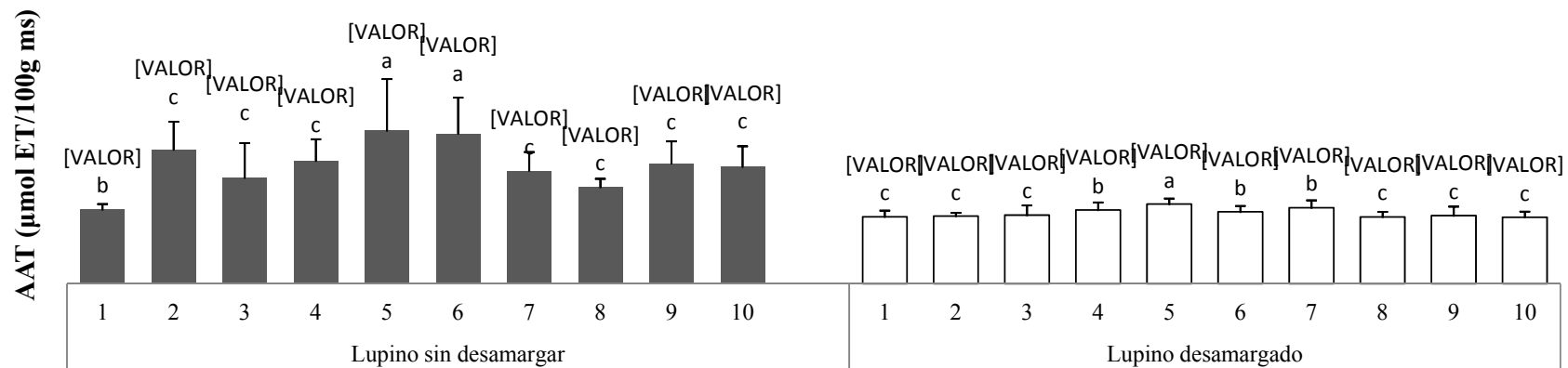
a) Lupino sin desamargar

La actividad antioxidante (AAT) de los genotipos *L. mutabilis* sin desamargar estuvo en un rango de 375 a 775 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$ y el *L. albus* un valor de 591 (Ver Figura 11). Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de AAT (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13). Los genotipos agrupados por su contenido de AAT fueron en promedio 700 $\mu\text{mol ET}/\text{g ms}$ (MB, H6), 600 (YY, VI, ALT), 500 (CHF, CBS, ALBUS), 400 (AND) y 300 (AAHO). Es importante resaltar que los genotipos H6 y MB fueron los que presentaron mayor valor de AAT, éstos presentaron manchas en el grano (pigmentos que pueden ser antocianinas o carotenoides), las cuales son considerados antioxidantes.

Al comparar el resultado obtenido con otros estudios de lupinos, se observa que son superiores a lo reportados por otros autores. Galvez *et al* (2009) reportan para *L. mutabilis* de 90 - 250 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$ y de 142 – 678 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$ para el *L. albus*. Los valores superiores se deben en gran medida al método utilizado.

Para el presente estudio se aplicó el método DPPH citado por Plank *et al* (2012) en el cual los componentes antioxidantes se van extrayendo y en simultáneo van reaccionando con el radical DPPH, mientras que el método convencional de DPPH realiza primero la extracción de componentes antioxidantes para luego reaccionarlos con el DPPH.

Plank *et al* (2012) señala que se logra una mayor extracción de antioxidantes cuando se hace la reacción con el radical, en el mismo momento en que los antioxidantes de la muestra están siendo extraídos. El autor reporta una comparación de AAT determinado bajo el mismo método y se puede decir que los lupinos sin desamargar presentan un contenido antioxidante similar al del té verde y yogurth con 644 y 561 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g ms}$ respectivamente, superior al del jugo de zanahoria y leche de almendras con 172 y 131 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g ms}$, e inferior frente a: cereal de avena (1739 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$), jugo de arándanos (1859 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$), vino tinto (1935 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$) y jugo de granada (3901 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$).



Media de actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$) \pm IC (intervalo de confianza) al 95% ($n=2$). Diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0.05$.

Figura 11: Contenido Antioxidante de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

Por otro lado Galvez *et al* (2009) señala que la soja supera al lupino en contenido antioxidante por su elevado contenido de isoflavonas. En el presente estudio también se analizó como comparación al lupino los datos de sachá inchi y pepa de uva los cuales reportaron valores superiores al lupino sin desamargar. Para la pepa de uva se reportó 1298.9 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$, para la flor de sachá inchi 1566 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$, para la semilla de sachá inchi 1143 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$ y para las hojas 1000 $\mu\text{mol ET}/\text{g ms}$.

Según Tsaliki *et al* (1999) explican que la actividad antioxidante del lupinos es debido a su contenido de fenoles, fosfolípidos y ácidos péptido/amino presentes, las cuales tienen importancia fisiológica y tecnológica.

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos presentaron valores de AAT en un rango de 336 a 403 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$ (Ver Figura 11). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de AAT (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13).

El proceso de desamargado produjo disminución de AAT de los diez genotipos (Ver Figura 11). Las disminuciones relativas se dieron alrededor de 50% (MB, ALT), 40% (VI, ALBUS, YY, H6), 30% (AND, CBS, CHF) y menos de 10% (AAHO).

Según Tsaliki *et al* (1999) y Mostafa *et al* (2013) la disminución del contenido antioxidante del lupino por el desamargado se debe a la pérdida de polifenoles, tocoferoles, fosfolípidos y flavonoides que son solubles en agua y se eliminan en el lavado.

Finalmente se podría señalar que los genotipos desamargados que presentaron mayores valores finales de AAT fueron el H6, MB, VI y CBS, considerando que sus rangos de pérdida fueron elevados por el proceso de desamargado acuoso (10-50%) sus productos finales presentan contenidos de AAT mayores que todos (promedio de 381 $\mu\text{mol ET}/100\text{gms}$ y este valor es cercano al valor AAT del Té verde (644 $\mu\text{mol ET}/100\text{gms}$). El ALBUS como todos los demás presentó valor final de 336 $\mu\text{mol ET}/100\text{gms}$, un valor mas alejado del referente del Té verde.

4.7 REDUCCIÓN DE FACTORES ANTINUTRICIONALES

4.7.1 OLIGOSACÁRIDOS

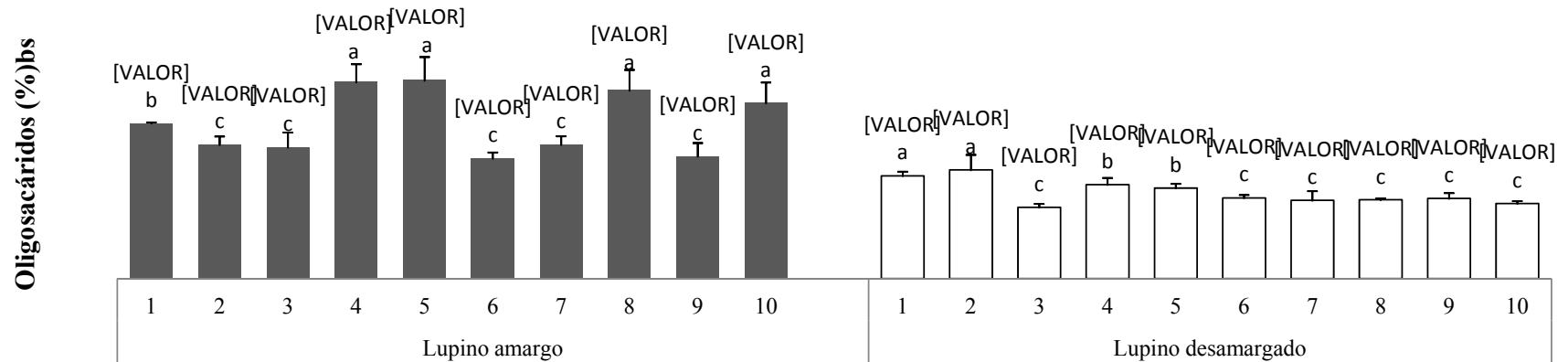
a) Lupino sin desamargar

Los oligosacáridos de los genotipos de lupino sin desamargar estuvieron en un rango de 19 a 25% (Ver Figura 12). Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de oligosacáridos (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13). Los genotipos agrupados por su contenido de oligosacáridos fueron 20% (VI, H6, AND, ALBUS) y 10% (AAHO, ALT, CHF, MB, CBS, YY). Los resultados estuvieron por encima de los reportes dados por otros autores. Gross *et al* (1988) reportan 14% en promedio de oligosacáridos para *L. mutabilis* procedentes de Chile y Martínez-Villaluenga *et al* (2006) reporta de de 8 a 9% para el *L. albus* de España.

Un valor elevado de oligosacáridos no es ventajoso ya que los oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) son considerados factores anti-nutricionales porque no son metabolizados y produce problemas intestinales (gases, dolor abdominal y disenterías) (Aguilera *et al.*, 2009; Price *et al.*, 1988, Saini, 1989). Cabe resaltar que es posible que estos elevados valores obtenidos frente a otros estudios sea debido al metodo utilizado, en espectrofotometría existe muchas interferencias que alteran el resultado real (pigmentos, aminoácidos, ácidos orgánicos, cenizas, péptidos de bajo peso molecular) componentes con carga que deberian ser eliminados con resinas de intercambio iónico (BeMiller, 2010). El presente trabajo no realizó no purificación por la cantidad de muestras analizadas.

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos presentaron valores de oligosacáridos en un rango de 9 a 13% (Ver Figura 12). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de oligosacáridos (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13).



Media de Oligosacáridos (%bs) \pm IC (intervalo de confianza) al 95% (n=3). Diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha= 0.05$.

Figura 12: Oligosacáridos de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

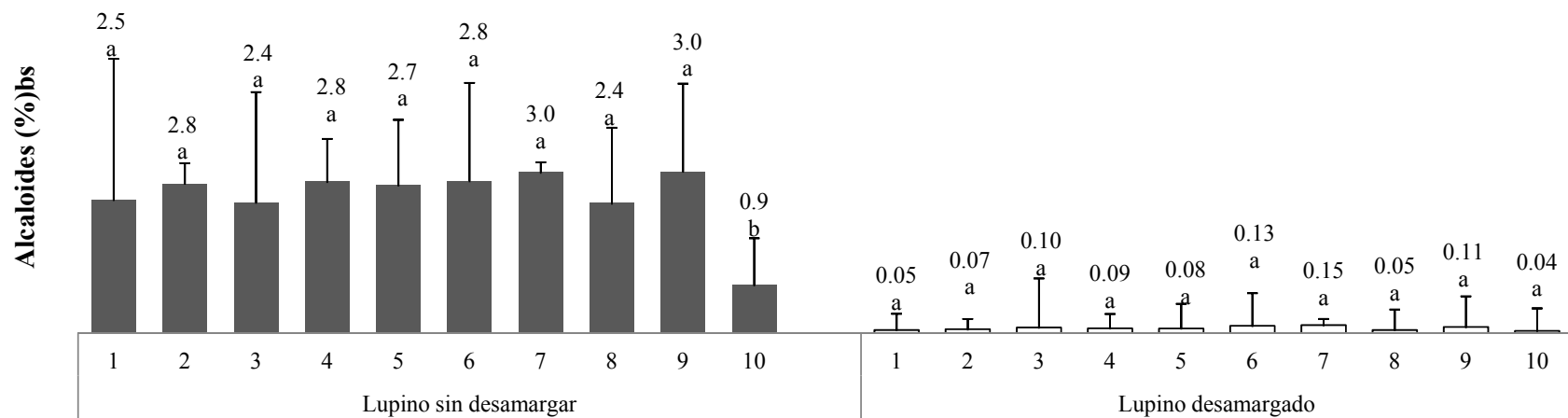
El proceso de desamargado produjo disminución de oligosacáridos de los *L. mutabilis* y del *L. albus* (Ver Figura 11 y ANVA, Anexo 13). Las disminuciones relativas se dieron alrededor de 50% (VI, H6, ALBUS, AND), 40% (CBS, CHF), 30% (MB, YY, AAHO) y 10% (ALT). Fennema (2010) señala que los oligosacáridos son carbohidratos de 2 a 10 unidades de monosacáridos por tanto son solubles en agua, los cuales se pierden en los lavados.

De los resultados obtenidos, Gulewicz *et al* (2000) reportan que un contenido igual o menor a 1% en oligosacáridos es el óptimo para ser considerado no perjudicial digestivo. No se logró obtener este nivel, sin embargo los valores de 9 a 13% de oligosacáridos finales en el producto desamargado para los genotipos en estudio es considerable. Un método que no buscó específicamente reducir los oligosacáridos. Esta reducción posiblemente se debió al remojo y la cocción como los señalan otras investigaciones (Doblado *et al.*, 2003; Khokhar *et al.*, 1996; Vidal-Valverde *et al.*, 1993a; Vidal-Valverde *et al.*, 1993b). Finalmente se podría señalar que aunque los genotipos CHF y ALBUS que presentaron mayor disminución 50% sus niveles finales de 9% de oligosacáridos fueron superior a los valores sugeridos para inocuidad de 1% (Gulewicz *et al.*, 2000).

4.7.2 ALCALOIDES TOTALES

a) Lupino sin desamargar

Los alcaloides totales de los genotipos de lupino sin desamargar estuvieron en un rango de 0.9 a 3% (Ver Figura 13). Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de alcaloides (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 13). Los genotipos agrupados por su contenido de alcaloides fueron: 3% (H6, ALT, VI, MB, CBS, YY), 2% (ANDD, CHF, AAHO) y 1% (ALBUS). Los resultados fueron cercanos a lo que reportan otros autores. Para el *L. mutabilis* se reporta valores de 0.2 a 4.5% de alcaloides totales (Muzquiz *et al.*, 1989; Gross y Bunting, 1982; Repo-Carrasco, 1988; Schoneberger *et al.*, 1981; Sosa, 2000; Villacreces, 2011). Respecto al *L. albus* existen autores que señalan que el *L. albus* no debe poseer alcaloides o los poseen



Media de Alcaloides Totales (% bs) \pm IC (intervalo de confianza) al 95% (n=2). Diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0.05$.

Figura 13: Alcaloides totales de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

en un contenido mínimo (Resta *et al.*, 2008), otros autores reportan para *L. albus*, valores mayores de 1% hasta 2.7% (Muzquiz *et al.*, 1989; Mostafa *et al.*, 2013). Se conoce también que los alcaloides se originan como medio de defensa de la planta frente al ambiente desfavorable. Entonces el *L. albus* analizado puede que haya crecido en medios desfavorables lo cual dio inicio al origen de dichos componentes. De los resultados obtenidos se puede decir que las semillas iniciales del *L. mutabilis* son lupinos amargos y el *L. albus* es un lupino dulce (Gross y Bunting, 1982).

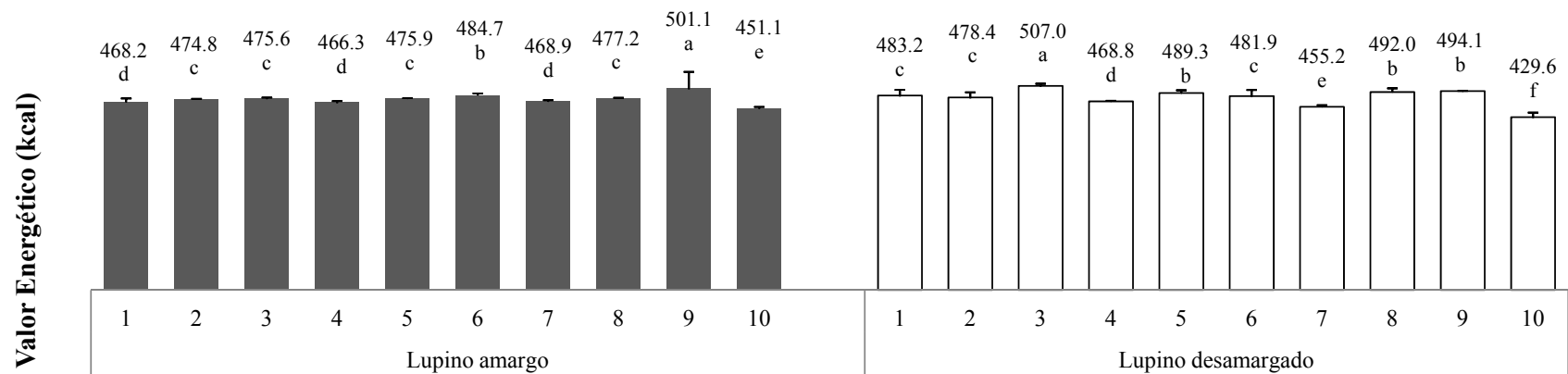
b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos presentaron valores de alcaloides en un rango de 0.04 a 0.15% (Ver Figura 13). No se encontró diferencias significativas entre alguno de los genotipos desamargados (Ver ANOVA en Anexo 13). El proceso de desamargado produjo disminución de alcaloides de los *L. mutabilis* y del *L. albus*. La disminución relativa de alcaloides se dió en un rango de 95 a 98%. Los valores finales de alcaloides totales presentes en los genotipos están cerca a los reportes dados por otros autores. Entonces todos los genotipos son fuente aprovechable libre de alcaloides totales. Mostafa *et al* (2013) reporta un contenido de 0.03% de alcaloides totales después del desamargado del *L. albus* de Egipto. Villacreces (2011) reportó un contenido de 0.2% después de desamargar el *L. mutabilis* de Ecuador. Sosa (2000) reportó contenido de 0.1% de *L. mutabilis* desamargado. Entonces el efecto del desamargado sobre el contenido alcaloides tuvo efecto positivo. Los valores obtenidos no sobrepasan el límite permitido por las normas establecidas por autoridades de salud, como las normas europeas que señalan como límite máximo 0.1% (ANZFA, 2001; ACFNP, 1996; Bulletin, 1998).

4.8 VARIACIÓN DE VALOR ENERGÉTICO

a) Lupino sin desamargar

El valor energético de los genotipos de lupino sin desamargar estuvo en un rango de 451 a 501 kcal (Ver Figura 14).



Media de Valores Energéticos (kcal) \pm IC (intervalo de confianza) al 95% (n=2). Diez genotipos de lupino: 1) AAHO (La Libertad), 2) Altagracia (Ancash), 3) Cholo Fuerte (Ancash), 4) Vicos (Ancash), 5) H6 (Junín), 6) Moteado Beige (Junín), 7) Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín), 8) Andenes (Cuzco), 9) Yunguyo (Puno), *L. albus* (Lima). Letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0.05$.

Figura 14: Valor energético de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

Se encontró que de los diez genotipos de lupino sin desamargar, existen algunos que difieren estadísticamente en contenido de valor energético (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11). Los genotipos agrupados por su valor energético fueron: 500 kcal (YY) y 400 kcal (ALBUS, VI, AAHO, CBS, ALT, CHF, H6, AND, MB).

Comparando los resultados con otros estudios, se observó que presentan valores energéticos similares a los encontrados. Los estudios reportan valores de 446 - 551 kcal para el *L. mutabilis* y de 379 a 401 kcal para el *L. albus* (Gross, 1982a; Sosa, 2000; Ministerio de salud e instituto de salud, 2009). Al comparar con la soja se observa que tienen el mismo valor energético (482-501 kcal) y superiores a otras leguminosas que presentan de 350 a 360 kcal) (Ministerio de salud e instituto de salud, 2009).

b) Lupino desamargado

Después del desamargado acuoso los genotipos presentaron valores energéticos en un rango de 430 a 507 kcal (Ver Figura 14). Se encontró que de los diez genotipos de lupino desamargados, existen algunos que difieren estadísticamente en valor energético (Ver ANOVA y Tukey en Anexo 11).

Se observa que el proceso de desamargado no tuvo efecto significativo de disminución o aumento de su valor energético inicial. Aunque no hay variación significativa del valor energético se observa que existen algunos genotipos que aumentan su valor y otros disminuyen por el proceso de desamargado. Otros autores también reportan el mismo perfil de aumento y/o disminución dentro de un rango de valores de 329 a 496 kcal para *L. mutabilis* desamargados (Villacreces, 2011; Villaverde, 2011; Schoeneberger *et al.*, 1981).

V. CONCLUSIONES

1. El peso húmedo de los genotipos se incrementan en más del 100% por el desamargado acuoso, siendo los genotipos desamargados que presentaron mayores pesos el CBS, AND, VI y YY.
2. Los diez genotipos presentaron un rendimiento en base seca promedio de 76%.
3. La proteína de los genotipos de lupino incrementa después del desamargado acuoso en un rango de 10 - 20%, siendo los genotipos desamargados ALT, H6 y CBS los que presentaron mayores valores finales, alrededor de 50%.
4. Los carbohidratos de los lupinos disminuyen después del desamargado acuoso en un rango de 10 - 30%, siendo los genotipos desamargados VI, CBS, MB, AAHO, YY y ALBUS los que presentaron mayores valores finales, alrededor de 25-54%.
5. La mitad de los genotipos incrementa porcentualmente su contenido de extracto etéreo después del desamargado acuoso en un rango de 10 - 20% y el resto disminuye en un rango de 10 - 40%, siendo los genotipos desamargados YY, MB y CHF los que presentaron mayores valores finales, alrededor 18-24%.
6. La fibra cruda de los lupinos incrementa porcentualmente en un rango de 10 - 100% después del desamargado acuoso, siendo los genotipos desamargados AND, MB, ALBUS los que presentaron mayores valores finales, alrededor de 11-21%.
7. La ceniza de los genotipos disminuye porcentualmente en un rango de 10-40% después del desamargado acuoso, siendo el genotipo desamargado VI el que presentó mayor valor final de 4%.

8. La actividad antioxidante de los genotipos de lupino disminuye después del proceso de desamargado acuoso en un rango de 10 a 50%, siendo los genotipos desamargados MB, H6, VI, CBS los que presentaron mayores valores finales en promedio de 381 $\mu\text{mol ET}/100\text{g ms}$.
9. Los genotipos de lupino disminuyen su contenido de oligosacáridos por el proceso de desamargado acuoso en un rango de 10 - 50%, siendo los genotipos CHF y ALBUS los que presentan el menor valor final (9%), aunque superiores al nivel mínimo sugerido por norma (1%).
10. El contenido de alcaloides de los diez genotipos de lupino disminuyen por el proceso de desamargado acuoso en un rango de 95-98%, alcanzando niveles aptos (0.05-0.2%) según lo recomendado por norma 0.2%.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se debería evaluar combinación de métodos de desamargado para minimizar el contenido de oligosacáridos de los lupinos a niveles por debajo del límite dado por norma.
2. Un estudio comparativo de método de actividad antioxidante, el tradicional y método de Plank *et al* (2012) en un mismo lupino para validar procedimientos.
3. El estudio de alcaloides de aguas residuales del lavado y su evaluación de uso como insecticida.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, J. 1993. Tannins in leaves of portuguese mediterranean trees. In: Papanastasis (Ed.) Agriculture. Agrimed research programme. Fodder trees and shrubs in the Mediterranean production systems: objectives and expected results of the EC research contract. V. Commission of the European Communities. pp: 85-87.
2. ACNFP. 1996. Report on seeds from narrow leafed lupin, Appendix IX, MAFF Publications, London, GB, p. 107.
3. ADLERCREUTZ, H. Y MAZUR, W. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine* 29: 95–120.
4. AGUILERA, J. Y TRIER, A. 1978. The revival of the lupin. *Food technology*. Pp: 70-76.
5. AGUILERA, Y.; MARTIN, M.; BENITEZ, V.; MOLL, V.; LOPEZ, J.; ESTEBAN, R. 2009. Change in carbohydrate fraction during dehydration process of common legumes. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22: 678-683.
6. ALIAGA, P. 2007. Efecto del desextracto etéreo sobre la actividad del inhibidor de tripsina en raíces de camote. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Agraria La Molina. *Anales científicos UNALM* 68(2). Lima-Perú.
7. AL-SAIKHAN, M.; HOWARD, L.; MILLER, J. 1995. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.) *Journal of Food Science*. (60) 2: 341-343.

8. ALVARADO, M. 2006. Efecto de la adición de los derivados de *Lupinus spp* (aislado, harina y concentrado proteico) sobre las características de textura de la salchicha. Tesis para obtener el título de ingeniero agroindustrial. México.
9. ANCHORENA, C. 1999. Determinación de los ácidos grasos del extracto etéreo de tarwi (*Lupinus mutabilis*) y estudio de su conservación en almacenamiento. Tesis de Ingeniero de Industrias alimentarias. UNALM. Lima. Perú.
10. AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. EUA.
11. ARANEDA, X. 2012. Desamargado de lupino (*L. albus L*) mediante extracción de alcaloides. Revista Innovagro. Revista de extensión de la escuela de agronomía de la Universidad Católica de Temuco 2012. Chile.
12. ARAUCO, E. 2011. Caracterización de la variabilidad fenotípica y componentes de rendimiento de colecciones de tarwi (*Lupinus mutabilis S.*) de la región central del Perú. Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo. Perú
13. ANZFA. 2001. AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD AUTHORITY. Lupin alkaloids in food. A toxicological review and risk assessment. Techn. Rep. Series 3: 1-21. En línea: <http://www.anzfa.gov.au>
14. AYET, G.; MUZQUIZ, M.; BURBANO, C.; ROBREDO, L.M; CUADRADO, C.; PRICE, K.R. 1996. Determination of saponins in the main legums cultivated in Spain. Food Science and Technology International. 2(2): 95-100.
15. BAER, D. 1978. Procedimiento rápido para la determinación de los alcaloides totales en *Lupinus mutabilis* con purpura de bromocresol (bcp). Proyecto Lupino. Informe #3. Lima, Peru. Pp: 102-108.

16. BERTI, P.; VILLACRÉS, E.; SEGOVIA, G.; MAZON, N.; PERALTA, E. 2013. *Lupinus mutabilis Sweet*, a traditional Ecuadorian grain: Fatty acid composition, use in the Ecuadorian food system, and potential for reducing malnutrition. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*. 2(6) : 153-159.
17. BEMILLER, J. 2009. Carbohydrate analysis. Chapter 10. Nielsen S. *Food Analysis, Food Science Texts Series*. Springer Science, 2010. Disponible en dirección electrónica:
18. BLANCO, G. 1974. Investigaciones agrícolas de tarwi en la universidad del Cuzco. Proyecto Lupino: Instituto de Nutrición. Informe N° 2. Pp: 5-9.
19. BOSCHIN, G.; D'AGOSTINA, P.; AMOLDI, A. 2008. Effect of genotype and environment on fatty acid composition of *Lupinus albus* L. seeds. *Food Chemistry* 108:600-606.
20. BULLETIN. 1998. Bulletin Officiel N° 98/27 du Conseil supérieur d'hygiène publique de France.
21. BURBANO, C.; BOUTHELIER, V.; MUZQUIZ, M.; GIAASER, L.; RODRIGUES-MARIN, A. 1982. *Lupinus angustifolius*, composición de los elementos esenciales en distintas variedades cultivadas y espontáneas de la península Ibérica. En: II Conferencia Internacional Del Lupino, Torremolinos. España.
22. BUTLER, G.; BOS, K. 1993. Analysis and characterization of tannins in faba beans, cereals and other seeds. A literature review. In: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds: proceedings of the Second International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds'*, Wageningen, The Netherlands, 1-3 December 1993. Poel, A.F.B. van der, J. Huisman and H.S. Saini (Editors). EAAP Publication no. 70. Wageningen Pers. Netherlands. pp 81- 90.

23. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. 1995. Use of the free radical method to evaluate antioxidant capacity. *Technology*. 28: 25-31.
24. BRADFORD, 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: 248-254.
25. CÁCERES, A. 2012. Elaboración de análogos de carne molida de res provenientes de las mezclas de lupino (*L. mutabilis*), cebada (*Dodeum vulgare*) y soja (*Glycine max*). Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentarias. UNALM. Lima, Perú.
26. CASTAÑEDA, B.; MANRIQUE, R.; GAMARRA, F.; MUÑOZ, A.; RAMOS, F.; LIZARASO, F.; MARTINEZ, J. 2008. Probiótico elaborado en base a las semillas del *Lupinus mutabilis* sweet (chocho o tarwi). Universidad San Martín de Porras. *Act Med Per*. 25(4): 210 - 215.
27. CASTAÑEDA, M. 1988. Estudio comparativo de diez variedades de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) conducidos en dos ambientes de la sierra norte y centro del Perú. Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo. UNALM. Lima. Perú.
28. CASTILLO, R. 1979. Extracción y caracterización de extracto etéreo de semilla de tarhui (*Lupinus mutabilis*). Tesis de Ingeniero de Industrias Alimentarias. UNALM. Lima. Perú.
29. CÁRDENAS, B. 1977. El cultivo del lupino en Chile. En: I Reunión de trabajo, fundación Chile. Situación, análisis y perspectivas del lupino en Chile. 1 y 2 de diciembre. Santiago. Chile. Pp: 27-35.
30. COSIO, P.; BLANCO, M.; BAUDOIN, J. 2010. Conservación de germoplasma de tarwi (*Lupinus mutabilis sweet*) en el CICA-FAZ-UNSAAC. Primer congreso peruano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima. Perú.

31. COLLAZOS, C. 1993. La composición de alimentos de mayor consumo en el Perú. 6ta edición. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Nutrición. Banco Central de Reserva. Lima, Perú.
32. COWLIN, W.; BUIRCHELL, B.; TAPIA, M. 1998. Lupin: *Lupinus L.* Promotion the conservation and use of underutilized and neglected crops. International plant genetic resources institute. Italia.
33. CUBERO, J. y MORENO, M. 1983. Leguminosas de grano. Editorial Madrid.
34. CHAMP, M. 2002. Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition*, 88(3), 307–319.
35. CHAPLEAU, N. y LAMBALLERIE, M. 2003. Changes in myofibrillar proteins interactions and rheological properties induced by high-pressure processing. *European Food Research and Technology*, 216, 470–476.
36. CHAVEZ, E. Y UNTIED, P. 1979. El programa de producción de lupino, tarwi o chocho en el Perú. Proyecto Lupino. Instituto de Nutrición. Informe N°4. Pp: 48-66
37. CHEEKE, P. 1971. Nutritional and physiological implication of saponins. A review. *Canadian Journal of Animal Science*, 51:621-623.
38. CHEKE, P. y KELLY, J. 1989. Metabolism, toxicity and nutritional implications of quinolizidine (lupin) alkaloids. In: J. Huisman, T.F.B. van der Poel and I. E. Liener (Eds). Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Proceedings of the 1st International workshop on antinutritional factors (ANF) in Legume seeds, November 23-25, 1988. Pudoc, Wageningen Netherlands. 189-210.

39. CHEFTEL J. 1989. Proteínas Alimentarias: Bioquímica-Propiedades funcionales-Valor nutricional-Modificaciones químicas. Zaragoza. España. Editorial Acribia S.A.

40. DE CORTES, M.; ALTARES, P.; PEDROSA, M.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; GOYOAGA, C.; MUZQUIZ, M.; JIMENEZ, C.; DAVILA, G. 2005. Alkaloid variation during germination in different lupin species. *Food Chemistry*. 90: 347-355.

41. DE LA CUADRA, C.; MUZQUIZ, M.; BURBANO, C.; AYET, G.; CALVO, R.; OSAGIE, A.; CUADRADO, C. 1994. Alkaloid, α -galactoside and phytic acid changes in germinating lupin seeds. *Journal Science Food Agriculture*. 66, 357-364.

42. DÍAZ, E. 1990. Porcentaje de proteínas, extracto etéreos y alcaloides de seis líneas seleccionadas de tarwi. Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo. Perú.

43. DOBLADO, R.; FRIAS, J.; MUÑOZ, R.; VIDAL-VALVERDE, C. 2003. Fermentation of *Vigna Sinensis* var. carilla flours by natural microflora and *Lactobacillus species*. *Journal of Food Protection*, 66, 2313–2330

44. EGGUM, B.; TOMES, G.; BEAMES, R.; DATTA, F. 1993. Protein and energy evaluation with rats of seed from 11 lupin cultivars. *Animal Feed Science and Technology*. 43: 109 - 119.

45. ENGELMANN, E. 1983. Actividades y avances de los proyectos lupino y cebada. Segunda reunión de coordinación nacional de los proyectos lupino y cebada. Instituto Nacional de Investigación y promoción agropecuaria. Sociedad Alemana de cooperación técnica. Convenio de cooperación técnica entre la república de Perú y la república federal de Alemania. Lima. Perú.

46. ESPINOZA, F.; YAÑEZ, E.; GARATE, O. 1984. Conocimiento y realidad del lupino en Chile. FAO-INTA. Santiago, Chile.

47. ERBAS, M.; CERTEL, M.; USLU, M. 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus L.*). Food Chemistry. 89: 341–345.
48. ERDEMOGLU, N.S.; OZKAN, S.; TOSUM, F. 2007. Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius L.* alkaloid extract. Phytochemistry Review 6: 197-201
49. FAO. 1982. El cultivo y la utilización del tarwi (*Lupinus mutabilis*). Roma. Pp: 12, 143-149, 151.
50. FAO. 2013. Food and agriculture organization of the united nations. En línea: (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>)
51. FAO. 2002. Food energy - methods of analysis and conversion factors. Rome:FAO; 2002. Report of Technical Workshop, Food and Nutrition Paper N.º 77.
52. FERNÁNDEZ, V. 1989. Tamales enriquecidos con harina de lupino. Tesis para optar el título de Ingeniero zootecnista. UNALM. Lima. Perú.
53. FENWICK, D.; OAKENFULL, D. 1981. Saponin content of soya beans and some commercial soya bean products. Journal of the Science of Food and Agriculture. 32 (3): 273–278.
54. FENNEMA, O. 2010. Química de los Alimentos. 3ra Edición. Editorial Acribia. España.
55. FRANCIS, G.; MAKKAR, H.; BECKER, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effect in fish. Aquaculture 199: 197-227.
56. GAMARRA, A. 1979. Diferentes niveles de torta de lupino (*L. mutabilis*) sin desamargar como reemplazante de torta de soya en alimentos de pollo de carne. Tesis para optar el título de Ingeniero zootecnista. UNALM. Lima. Perú.

57. GÁLVEZ, L.; GENOVESE, M.; LAJOLO, F. 2009. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 22:397–404
58. GLENCROSS, B. 2001. Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds (pp. 1–12). Western Australia: Department of Fisheries.
59. GLENCROSS, B.; CURNOW, J.; HAWKINS, W.; FELSING, M. 2002. Evaluation of yellow lupin, *Lupinus luteus*, meal as an alternative protein resource in diets for sea cage reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the world aquaculture society*. 33 (3): 287-296.
60. GLENCROSS, B.; CURNOW, J.; HAWKINS, W.; KISSIL, G.; PETERSON, D. 2003. Evaluation of the feed value of a transgenic strain of the narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) in the diet of the marine fish. *Pagrus auratus*. *Aquaculture Nutrition*. 9: 197-206
61. GLENCROSS, B. 2008. Harvesting the benefits of lupin meals in aquaculture feeds. *Lupins for Health and Wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia.*
62. GLENCROSS, B.; HAWKINS, W.; EVANS, D.; RUTHERFORD, N.; MCCAFFERTY, P.; DODS, K.; KAROPOULOS, M.; VEITCH, C.; SIPSAS, S.; BUIRCHELL, B. 2008A. Variability in the composition of lupin (*Lupinus angustifolius*) meals influences their digestible nutrient and energy value when fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 277: 220-230.
63. GUEGUEN, J.; VAN OORT, M.G.; QUILLIEN, L.; HESSING, M. 1993. The composition, biochemical characteristics and analysis of proteinaceous antinutritional factors in legume seeds. A review. In: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds: proceedings of the Second International*

Workshop on 'Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds', Wageningen, The Netherlands, 1-3 December 1993. Poel, A.F.B. van der, J. Huisman and H.S. Saini (Editors). EAAP Publication no. 70. Wageningen Pers, Netherlands. pp 9-30.

64. GUILLAMON, E.; PEDROSA, M.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; SANCHEZ, M.; MUZQUIZ, M. 2008. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chemistry*. 107: 68-74.
65. GLORIO, P. 1990. Evaluación de la calidad de un producto deshidratado a base de papa (*Solanum tuberosum*), lupino (*Lupinus mutabilis*) y huevo. Tesis para optar el grado de Magister en Tecnología de alimentos. UNALM. Lima, Perú.
66. GROSS, R.; GODOMAR, R. 1982. Desarrollo y Aceptabilidad de Productos de Lupino (*Lupinus mutabilis*). Proyecto Lupino-Instituto de Nutrición. informe # 8. Pp: 125-141
67. GROSS, R. 1982. El cultivo y la utilización del tarwi. Agencia Alemana de Cooperación Técnica (Gtz)
68. GROSS, R. y VON BAER. 1977. Posibilidades del *lupinus mutabilis* y *lupinus albus* en los países andinos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 27(4): 451-472.
69. GROSS, R. 1982A. Cultivo y utilización de los lupinos. Estudio FAO: Producción y protección vegetal. 36: 142-147.
70. GROSS, R. Y BUNTING, E. 1982. Agricultural and nutritional aspects of Lupines Proceedings of the first international lupin workshop. Eschbom. Alemania.
71. GROSS, R.; VON BAER, E.; KOCH, F.; MARQUARD, R.; TRUGO, L.; 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.

72. GROSS, R. Y TUESTA, L. 1977. El cultivo y la utilización de los lupinos. Perú: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Pp. 154-165
73. GULEWICZ, P.; CIESIOLKA, D.; FRÍAS, J.; VIDAL, C.; FREJNAGEL, S.; TROJANOWSKA, K. 2000. Simple method of isolation and purification of agalactosides from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3120–3123.
74. HALL, R.; JOHNSON, S.; BAXTER, A.; BALL, M. 2005. Lupin kernel fibre-enriched foods beneficially modify serum lipids in men. *European Journal of Clinical Nutrition*. 59(3): 325–333.
75. HAYES, R.; BOOKWALTER, G.; BAGLEY, E. 1977. Antioxidant activity of soybean flour and derivatives. A Review. *Journal Of Food Science*. 42: 1527-1532.
76. HATZOLD, TH.; ELMADFA, I.; GROSS, R.; WINK, M.; HARTMANN, TH.; WITTE L. 1983. Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 31: 934 - 930.
77. HUAMÁN, V. 1983. Elaboración de una bebida proteica en polvo a base de lupino (*Lupinus mutabilis*). Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentarias. UNALM. Lima, Perú.
78. HUISMAN, J.; TOLMAN, G. 1992. Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Garnsworthy, P.C., H. Haresing and D.J.A. Cole (Eds.). Butterworth Heinemann. U.K. pp 3-31.
79. HUYGHE, C. 1997. White lupin (*Lupinus albus L.*). *Fields Crops Research*. 53: 147–160.

80. INEN. (Instituto Ecuatoriano de Normalización). 2004. Norma Técnica NTE INEN 2390:2004: Leguminosas grano desamargado de chocho requisitos. 1era ed. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización. 5 p.
81. JACOBSEN, S. y MUJICA, A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis sweet.*) y sus parientes silvestres. Revista botánica económica de los andes centrales. UNA. Puno. Pp. 458-482.
82. JANSMAN, A. 1993. Tannins in feed feedstuffs for simple-stomached animals. Nutrition Research Reviews, 6:209-236.
83. JAROSLAW, C.; ZUBINSKI, J.; DWIECKI, K.; SIGER, A.; NEUNERT, G.; LAMPART-SZCZAPA, E. 2014. Characterisation of different digestion susceptibility of lupin seed globulins. Journal Food Chemistry (143): 418-426.
84. JIMÉNEZ, C.; HERNÁNDEZ, H.; ÁLVAREZ, G.; ROBLEDO, N.; MARTÍNEZ, J.; DÁVILA, 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: 421–428.
85. JUÁREZ, C.A.; LUCAS, F.B.; MORA, E.R.; DÁVILA, O.G. 1988. Detoxificación comparativa de tres especies de lupinos silvestres y del *Lupinus mutabilis* cultivada en México. V Congreso sobre el cultivo y explotación del lupino. Quito, Ecuador.
86. KAY, D.E. 1985. Legumbres alimenticias. Editorial acribia. Zaragoza, España. Pp: 253-272.
87. KHALIL, A.; EL-ADAWY, T. 1994. Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes. Food Chemistry. 50, p. 197–201.
88. KAHKONEN, M.; HOPIA, A.; VUORELA, H.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 47. 3954-4962

89. KEELER, R.; GROSS, R. 1979. El contenido total de alcaloide y de anagirina de alguna selecciones amargas y dulces de lupinos utilizados como alimento. Proyecto lupino-insituto de nutricion. Informe #4. Pp: 91-108.
90. KHOKHAR, S.; FRIAS, J.; PRICE, K.R. 1996. Physico-chemical characteristics of Khesari dhal (*Lathyrus sativus*): changes in alphagalactosides, monosaccharides and disaccharides during food processing. Journal of the Science and Food Agriculture. 70: 487-492.
91. KUMAR, R.; y D'MELLO, J.P.F. 1995. Antinutritional factors in forage legumes. In: Tropical Legumes in Animal Nutrition. D'Mello, J.P.F. and C. Devendra (Eds.). CAB International. U.K. pp 95-133
92. LAJOLO, F. y GENOVESE, M. 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 50: 6592-6598
93. LASTRA, H.; RODRÍGUEZ, E.; PONCE, H.; GONZÁLEZ, M. 2000. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. Revista Cubana Plant Med. 5(1):17-22.
94. LIENER, I. 1989. Antinutritional factors in legume seeds: state of the art. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Proc. Of the 1st international workshop on antinutritional factors (ANF) in legume seeds, november 1988. Wageningen. The Netherlands, 23-25.
95. LÓPEZ, F. 1977. Incidencia económica social del cultivo del lupino en la IX región. En: 1a Reunión De Trabajo, Fundación Chile. Situación, análisis y perspectivas del lupino en Chile. 1 Y 2 De Diciembre. Santiago, Chile, Pp: 17-19.
96. LOPEZ, A. 1987. Efecto de la adición de metionina y virginamicina en raciones que contienen *Lupinus albus* var. Multolupa en alimentación de broilers. Tesis,

M:V: Universidad Austral De Chile, Facultad De Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

97. LOPEZ, J.; TEJADA, I.; VASQUEZ, C.; GARZA, J.; SHIMADA, A. 2004. Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their in vitro biological activity: Part 1. *Journal of the Science Food and Agriculture* 84: 291-294 .
98. MCLEOD, M. 1974. Plants tannins; their role in forage quality. *Nut. Abstr. Rev.*, 44: 803-815.
99. MARTÍNEZ, M. 2005. Ecología de la semilla de *Lupinus bilineatus benth.* Tesis realizada para optar el título de ingeniero forestal. Universidad Autónoma De Chapingo. México.
100. MARTÍNEZ, S. 1987. Incorporación de penicilina procaína y metionina en raciones que contienen *lupinus luteus* en alimentación de broilers. Tesis, M:V:, Universidad Austral De Chile, Facultad De Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
101. MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; DURANTI, M. 2006A. Functional lupin seeds (*L. albus L. and L. luteus L.*) after extraction of α -galactosides. *Food Chemistry* 98:291-299.
102. MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose content in thirteen Spanish lupin cultivars. *Food Chemistry*, 91, 645–649.
103. MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; ZIELINSKI, H.; FRIAS, J.; PISKUTA, M.; KOZTOWSKA, H.; VIDAL-VALVERDE, C. 2009. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chemistry*. 112: 84-88.
104. MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S.; LEE, Y. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*. 339: 69-72.

105. MEDINA, M. 1987. Elaboración de concentrado proteico a partir de mezcla de lupino (*L. mutabilis*) y jurel (*Trachurus symmetricus murphy*) para la preparación de un caldo instantáneo. Tesis para optar el título de Magister en nutrición. UNALM. Lima, Peru.
106. MENESES, R.; WAAIJENBERG, H.; PIEROLA, L. 1996. Las leguminosas de Bolivia. Editorial Cosuda. Cochabamba, Bolivia.
107. MINAG. 2013. Oficina de estudios económicos y estadísticos. Ministerio de Agricultura. Series históricos de producción agrícola. Compendio estadístico. En línea: http://frenteweb.minag.gob.pe/sisca/?mod=consulta_cult.
108. MINISTERIO DE SALUD E INSTITUTO DE SALUD. 2009. Tablas peruanas de composición de alimentos. Lima. Peru.
109. MONTATIXE, G. 2005. Desarrollo y evaluación de la tecnología de fermentación sólida del grano desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador: ESPOCH ed, 2005:250.
110. MOLE, S.; WATERMAN, P. 1987. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia*, 72: 137-147.
111. MONTES, G.; HURTADO, A.; FERNANDO, P. 1984. Optimización del proceso de desamargado y desarrollo de una línea de fabricación de harina de tarwi a nivel rural. Proyecto de Investigación. Universidad Nacional Agraria la Molina.
112. MORENO, K. 2008. Estudio sobre las características nutricionales del chocho y propuesta gastronómica. Tesis para optar el título de Licenciatura en Administración Gastronómica. Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito. Ecuador.

113. MORÓN, C. 2005. Importancia de los cultivos andinos en la seguridad alimentaria y nutrición. Cultivos Andinos-FAO.
114. MOSTAFA, A. y HAIAM, E. 2013. Effect of debittering process on characterization of egyptian lupine seeds oil (*Lupinus albus*). Australian journal of basic and applied sciences. 7(2): 728-734
115. MUZQUIZ, M.; BURBANO, C.; PEDROSA, M.; FOLKMAN, W.; GULEWICZ K. 1999A. Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides. Preparative method of their isolation and purification. Journal Industrial Crops and Products. 19, 183-188.
116. MUZQUIZ, M.; GUILLAMON, E.; BURBANO, C.; PASCUAL, H.; CABELLOS B.; CUADRADO, C.; PEDROSA, M. 2011. Chemical composition of a new *Lupinus* species found in Spain, *Lupinus mariae-josephi* H. Pascual (*Fabaceae*). Spanish Journal of Agricultural. 9(4): 1233-1244.
117. MUZQUIZ, M.; RIDOUT, C.; PRICE, K.; FENWICK, R. 1993. The saponin content and composition of sweet and bitter lupin seed. Journal of the Science of Food and Agriculture. 63(1): 47-52
118. MUZQUIZ, M.; CUADRADO, C.; AYET, G.; DE LA CUADRA, C.; BURBANO, C.; OSAGIE, A. 1994. Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(7), 1447-1450.
119. MÚZQUIZ, M.; BURBANO, C.; GOROSPE, M.; RÓDENAS, I. 1989. A chemical study of *lupinus hispanicus* seedtoxic and antinutritional components. Journal of the Science of Food and Agriculture., 47: 205-214.
120. MUÑOZ, A.M. 1979. Evaluacion quimica, bromatologica y nutricional de las combinaciones de papa, tarwi, quinua y cebada. Tesis para optar el titulo de Magister en nutricion. UNALM. Lima, Peru.

121. NEIVA, R. y ZANETTE, F. 2005. Variations of carbohydrate content in two year old buds and stems of apple tree region of low chill occurrence. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 27(3). 352-355.
122. NEVES, J. 1993. Lupin genetic resources around the world. *Grain Legumes. The magazine of the european association for grain legume research*. 3: 15-17.
123. NIELSEN, S. 2010. *Analisis de los Alimentos*. Editorial Acribia. España.
124. NTP. 1980. NORMA TECNICA PERUANA. Cereales y menestras. Determinación de Fibra cruda. NTP 205.003:1980. Lima. Peru.
125. NUÑEZ, G.; HOLECHEK, J.; ARTHUN, D.; TEMBO, A.; WALLACE, J.; GALYEAN, M.; CARDENAS, M.; VALDEZ, R. 1992. Evaluation of fecal indicators for assessing energy and nitrogen status of cattle and goats. *Journal of range managenemet* 45: 143-147
126. OOMAH, B.; TIGER.; OLSON, M.; BALASUBRAMANIAN, P. 2006. Phenolics and Antioxidative Activities in Narrow-Leafed Lupins (*Lupinus angustifolius L.*). *Plant Food for Human Nutrition*, 61, 91–97.
127. ORTEGA, D.; RODRIGUEZ, A.; ARTURO, D.; ZAMORA-BURBANO, A. 2010. Caracterizacion de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los andes de Colombia. *Acta agronomica*. 59(1): 111-118.
128. ORTEGA, R.; PALACIOS, J. 1995. Efecto del tiempo de remojo, coccion y lavado sobre el contenido de alcaloides y proteina en el chocho (*Lupinus mutabilis sweet*). Tesis de Ingeniero de Alimentos. Universidad Tecnica de Ambato, Ecuador.
129. OSBORNE, T. 1907. The proteins of the wheat kernel, by Thomas B. Osborne. Carnegie Institution of Washington publication. Vol 84. Washington DC. EEUU.

130. PABLO, M. 2013. Caracterizaciomm del valor nutritivo de cinco especies de leguminosas del genero *Lupinus*. Tesis para optar el grano de maestra en ciencias. Colegio de Postgraduandos. Instituto de enseñaanza e Investigacion en ciencias agricolas. Mexico.
131. PEREVOLOTSKY, A. 1994. Tannins in Mediterranean woodlands species: lack of response to browsing and thinning. *Oikos*, 71: 333-340.
132. PETTERSON, D.; SIPSAS, S.; MACKINTOSH, J. 1997. The chemical composition and nutritive value of australian pulses (2nd ed.). Canberra: Grains Research and Development Corporation.
133. PEUMANS, W.J. y VAN DAMME, E. 1996. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends in Food Science and Technolgy*. 7: 132-138.
134. PIERGIOVANNI, A. y PIGNONE, D. 2003. Effect of year-to-year variation and genotype on trypsin inhibitor level in common bean (*Phaseolus vulgaris L*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 473–476.
135. PLANCHUELO, A. 1999. Biodiversity of lupins in south America. In: D.C. Hill (Ed). *Towards the 21st century*. Proc. 8th Int. Lupin Conf., 11-6 mayo 1996. Asilomar, California, 394-400.
136. PLANK D, SZ.; SAPIRSTEIN, H.; WOOLLARD, D.; ZAPF, CH.; LEE, V.; CHEN, C.; HAI, R.; TSAO, R.; DUSTERLOH, A.; BAUGU, S. 2012. Determination of antioxidant activity in Food and Beverages by reaction with 2,2'-diphenil-1-picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative study first action 2012.04. *Journal of AOAC International*. Vol. 95 (6). 1562-1569.
137. PRATT, D. 1992. Natural antioxidants from plant material. In Ho C.-T., C. Y. Lee & H.C. Tuan (Eds), *phenolic compounds in food and their effects on health*.

Antioxidants and cancer prevention, Vol II, (Pp. 54-71). ACS Symposium Series 507, Washington D.C.

138. PRATT, D. y BIRAC, P. 1979. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *Journal Of Food Science*. 44, 1720-1722.
139. PRICE, K.R.; EAGLES, J.; FENWICK, G.R. 1988. Saponin composition of 13 varieties of legumes seed using fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*. 42. 183–193.
140. PRICE, K.R. y FEWICK, G.R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 26:27-135.
141. RAMÍREZ, R. 1983. Determinación de algunos factores tóxicos del lupino (*L. mutabilis*). Tesis para optar el título de Ingeniero de industrias alimentarias. UNALM. Lima. Peru.
142. RESTA, D.; BOSCHIN, G.; D'AGOSTINA, A.; ARNOLDI, A. 2008. Quantification of quinolizidine alkaloids in lupin seeds, Lupin-based ingredients and foods. *Lupins for Health and Wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference*, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
143. REPO-CARRASCO, R. 1988. Cultivos andinos. Editorial centro Bartolomé de las Casas, Cuzco-Perú.
144. RODRIGUEZ, T. 1981. Obtención de aislado proteico a partir del lupino (*L. mutabilis*). Tesis para optar el título de Ingeniero de industrias alimentarias. UNALM. Lima. Perú.
145. RODRÍGUEZ, A. 2009. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus*

mutabilis Sweet). Tesis para obtener el título de Bioquímico farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador.

146. RODRÍGUEZ, T.; ALIAGA, T.; SCHOENEGER, H.; GROSS, R. 1982. Protein isolate from *lupinus mutabilis*. Proceedings of the first international lupine workshop. Lima, Cuzco. Peru. 1980. Ed. Gross R, Bunting E. Agricultural and Nutritional aspects of lupine.
147. ROMERO, C. y BAKKER, J. 2000. Effects of acetaldehyde in model wine solution international. *Journal of Food Science Technology*. 35:129-140.
148. ROY, F.; BOYE, J.; SIMPSON, B. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International* 43: 432–442.
149. RUIZ, M.A.; GARCIA, P.M.; CASTAÑEDA, H.; ZAMORA, N.J.F.; GARZÓN, P.; BAÑUELOS, J.; BURBANO, C.; PEDROSA, M.M.; CUADRADO, C.; MUZQUIZ, M. 2000. Chemical composition and antinutrient content of three *Lupinus* species from Jalisco, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*. 13, 193-199.
150. RUIZ, G.; PRICE, K.; ROSE, M.; ARTHUR, A.; PETERSON, D.; FENWICK, R. 1995. The effect of cultivar and environment on saponin content of Australian sweet lupin seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 69 (3): 347-451.
151. RUIZ, M.A.; RODRÍGUEZ, R.; NAVARRO, S. 2006. Evaluación químico-nutricional de *Lupinus exaltatus* Zucc, del nevado de Colima, México, como fuente potencial de forraje. *Interciencia*. 3 (10): 758-761,
152. SAHA, S. y BREWER, C. 1994. Determination of the concentration of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydrate Research*. 157-167.

153. SAINI, H. 1989. Legume seed oligosaccharides. In: Huisman J, Van Der Poel T, Liener E (Eds). Recent Advances of Research in Antinutritional Factors In Legume Seeds. Proc. Of the 1st International Workshop on Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds. November 23-25. Pudoc. Wageningen Netherlands. 329-341
154. SANDOVAL, A. 1987. Utilización de aditivos químicos en la elaboración de panes con sustitución parcial de harina de trigo por lupino. Tesis para optar el título de Ingeniero de industrias alimentarias. UNALM. Lima. Perú.
155. SANTANA, S.R. 1984. Uso de antioxidantes y preservativos químicos durante el almacenamiento de la harina no desextracto etérea de tarwi (*L. mutabilis sweet*). Tesis de Ingeniero de Industrias Alimentarias. UNALM. Lima. Perú
156. SATHE, S.; KSHIRSAGAR, H.; SHARMA, G. 2012. Solubilization, Fractionation, and Electrophoretic Characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.) Proteins. *Plants Food for Human Nutrition*. 67: 247-255.
157. SCARAFONI, A.; DICATALDO, C.; MAGM, C.; DURANTI, M. 2004. Lupin seeds as a source of nutraceuticals. In: Wild and cultivated lupins from tropics to the poles (van Santen e. And hill g.d., eds). Proc. 10th int lupin conf, Laugarvatn, Iceland. Pp. 352-355.
158. SCOTT, M.; NESHEIMM, M.; JOUNG, R.J. 1982. Nutrition of the chicken. 3ra Ed., M.L Scott & Associates. Ithaca. New York.
159. SCHOENEBERGER, H.; SAM, O.; CREMER, H.; GROSS, R. 1981. Investigación De La Calidad Proteína De *Lupinus Mutabilis* En Ratas Albinas. Proyecto cultivo Y utilización De Lupino: Informe N°5, Lima-Perú.
160. SIGER, A.; CZUBINSKI, J.; KACHLICKI, P.; DWIECKI, K.; LAMPART, E.; NOGALA, M. 2012. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of food composition and analysis*. 25: 190 - 197.

161. SKOOG, D. 2001. Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill- Madrid. Pp 325-996
162. SIRTORI, C.; LOVATI, M.; MANZONI, C.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M.; MAGNI, C. 2004. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *Journal of Nutrition*, 134(1), 18–23.
163. SOSA, C. 2000. Influencia de dos métodos de extracción de un aislado proteico de lupino (*L. mutabilis*) en sus propiedades funcionales. Tesis de magister. UNALM. Lima-Perú.
164. SOTO, N. 1983. Niveles de sustitución de harina de trigo por harina de lupino (*L. mutabilis*) para elaboración de galletas. Tesis para optar el título de Ingeniero de industrias alimentarias. UNALM. Lima. Peru.
165. SUJAK, A.; KOTLARZ, A.; STROBEL, W. 2006. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food chemistry* 98: 711-719.
166. SLAVIN, J. 1987. Dietary fiber: classification, chemical analysis, and food sources. *J. Am. Diet Ass.* 87:1164-1171.
167. TAPIA, E. 1982. Proceso agroindustrial del tarwi (*L. mutabilis*) investigación de los sistemas agrícolas andinos IICA/CIID, Cuzco, Perú.
168. THERMO SCIENTIFIC. s/a. Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit. Consultado el 03 mayo de 2013. Disponible en el <http://www.piercenet.com/instructions/2160129.pdf>
169. TSALIKI, E.; LAGOURI, V.; DOXASTAKIS, G. 1999. Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*L. albus ssp. Graecus*). *Journal Food Chemistry*. 65: 71-75.

170. VÁSQUEZ, J. 1983. El cultivo del tarwi o chocho en el Perú. Segunda reunión de coordinación nacional de los proyectos lupino y cebada. Instituto Nacional de Investigación y promoción agropecuaria. Sociedad Alemana de cooperación técnica. Convenio de cooperación técnica entre la república de Perú y la república federal de Alemania. Lima. Perú.
171. VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J.; PRODANOV, M.; TABERA, J.; RUIZ, R.; BACON, J. 1993A. Effect of natural fermentation on carbohydrates, riboflavin and trypsin inhibitor activity in lentils. *European Food Research and Technology*, 197, 449–452.
172. VIDAL-VALVERDE, C.; FRÍAS, J.; VALVERDE, S. 1993B. Changes in carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. *Journal of American Dietetic Association*, 93, 547–550.
173. VILLAVERDE, S. 2011. Evaluación de las propiedades funcionales del concentrado proteico del tarwi (*Lupinus mutabilis*) y su uso como extensor cárnico de jamonada. Tesis para obtener el título de Ingeniero de Industrias Alimentarias. Universidad Tecnológica del Centro del Perú. Huancayo. Perú.
174. VILLACRECES, N. 2011. Evaluación del procesamiento artesanal del Chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiológica. Tesis para optar el título de Ingeniero de Alimentos. Universidad San Francisco de Quito. Ecuador.
175. VIGO, C.; NARITA, E.; MARQUEZA, L. 2003. Validación de una metodología de cuantificación espectrofotométrica de las saponinas de *Puffia glomerata* (Spreng) Pedersen *Amaranthaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognósia*. 14(1): 46 – 49
176. VON BAER, E. 1986. El cultivo del lupino. *El campesino* CXCII 6: 21-30

177. WANG, H.; GUOHUA, C.; PRIOR, R. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 44. 701-705
178. ZAIA, D.; ZAIA, C.; LICHTIG, J. 1998. Determinacao de proteinas totais via espectrometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Journal Quimica Nova*. 21(6)
179. ZAMORA, F.; VIRGEN, C.; BERNAL, A.; FAUSTO, G.; RUIZ, L. 2008A. In vitro antifungal activity of *Lupinus montanus* extract and lupanine on *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. In: Proc. 10th Int. Lupin Conference. E. Van Santen, M. Wink, S. Weissmann, and P. Romer (Eds). Laugarvatn, Iceland. 255-256.
180. ZAMORA, F.; GARCIA, P.; RUIZ, M.; SALCEDO, E. 2008B. Composition of alkaloids in seeds of *lupinus mexicanus* (fabaceae) and antifungal and allelopathic evaluation of the alkaloid extract. *Agrociencia* 42: 185-192

VIII. ANEXOS

ANEXO 01. PROCEDIMIENTO DE DESAMARGADO DE LUPINO

PRELIMNARES DE DESAMARGADO DE LUPINO

(Adaptación de Jacobsen-Mujica, 2006)

a. Análisis de Metodología original

A pesar de que existe un gran número de métodos de desamargado se analizó la metodología reportada por Jacobsen y Mujica (2006) tomada del método tradicional del altiplano peruano (Puno) debido que podría señalarse como el método de desamargado originario y de gran uso hoy en día por los pobladores que cultivan tarwi. Se analizó con el objetivo de identificar los parámetros que requerían adaptación. La descripción del método original es como sigue:

- Remojo de 3 kg de tarwi y 18 Lt de agua (mp:agua 1:6) por 12 horas a T° ambiente.
- Cocción por 1 hora con cambio de agua cada 30 minutos, contando desde el hervor (mp:agua 1:3).
- Lavado en agua corriente (2-3 días) y agua estacionaria (5 días) con relación mp:agua (1:3) y cambio de agua cada 6 horas.
- Se consume fresco o se seca y almacena.

Resultados

Los factores que requerían adaptación fueron:

- Viabilidad técnica del lavado: no está definido si el lavado de flujo de agua corriente es mejor que el lavado de agua estacionaria. Las investigaciones también no tienen una posición definida sobre el método a utilizar (Sosa, 2000; Alvarado, 2006; Juárez et al., 1988; Tapia, 1982; Mostafa et al., 2013; Schoeneberger *et al.*, 1981; Villacreces, 2001; Villaverde, 2011; Berti *et al.*, 2013; Tsaliki et al., 1999; Ortega y Palacios, 1995; Alvarado, 2006). Se debió realizar pruebas comparativas entre ambos métodos.
- Tiempo de cambio de agua en lavado de agua estacionaria: El cambio de agua cada 6 horas no es viable por cuestión limitación de uso de laboratorio. Pese a que muchos

investigadores reportan dicho dato, eso también resultaría costoso por la gran cantidad de agua a utilizar, por tanto se utilizó 24 horas para los cambios así como lo reporta Tsaliki *et al* (1999).

1. Prueba de lavado en sistema de agua de flujo constante

Debido a que un lavado de lupino en flujo de agua constante (ríos) es muy utilizado en las zonas altas, se construyó un sistema de lavado piloto para evaluar su reproducibilidad y costo (Ver Figura 1.1). El procedimiento de lavado fue como sigue:

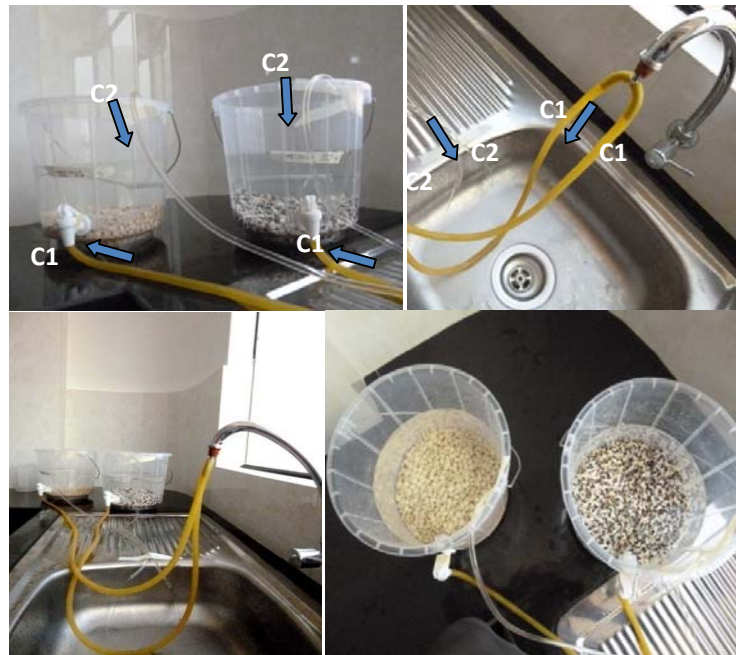


Figura 1.1. Sistema de lavado piloto del lupino en corriente de agua continua. C1 y C2 son canales de entrada y salida del agua

- Se utilizó 500 g de grano remojado y cocido por el método de Jacobsen-Mujica (2006).
- Se depositó en baldes de 10 Lt de capacidad y se lavó por 3 días con flujo de agua de entrada y salida de caudal 5mL/min, caudal muy inferior a lo presentado por Montes (1984) que utilizó un caudal de 1.4 L/min por 13 horas en un sistema de lavado tipo reactor. La entrada del agua al recipiente fue por la parte inferior con mangueras de goma y regulada con la llave del grifo y la salida del agua del recipiente fue por la

- parte superior con manguera de venoclisis y regulada con las válvulas de venoclisis (Ver Figura 1.1). El volumen de permanencia estática fue 500 g de muestra y 3 Lt de agua (mp:agua, 1:6).
- Se realizó un control de flujo de agua cada 2 horas retirando las mangueras del recipiente y vaciando un cierto volumen en una jarra graduada por unidad de tiempo.

RESULTADOS

El ensayo preliminar de desamargado de lupino en flujo de agua constante presentó inconvenientes debido a que el caudal de ingreso de agua no pudo ser controlado. Inicialmente (hora cero) se trabajó con un caudal de 5 mL/min pero después de 2 horas el caudal de entrada disminuyó radicalmente a 1mL/min, así fue fluctuando en el transcurso del día, en la noche (18 horas después) se incremento el caudal de entrada a mas de 10 mL/min. Todo esto no hizo reproducible el procedimiento y más aun no se podría evaluar el costo de uso de agua por la variabilidad del caudal. Se debió contar con una válvula tipo check para controlar el caudal y mejor aun contar con un sistema de recuperación de agua. Montes (1984) para lograr este flujo constante tuvo que trabajar en un equipo diseñado tipo reactor pero eso ya elevaría el costo.

Como las primeras 24 horas no fueron viables, se retiró las muestras de las recipientes en el día 2 y fueron desechadas, no se podía culminar y evaluar su composición proximal porque no sería reproducible.

2. Prueba de lavado en sistema de agua estacionaria

Debido a que el lavado en sistema de flujo de agua constante piloto no fue viable, se evaluó el lavado en remojo (materia prima en agua de reposo) adaptando de Jacobsen y Mujica (2006). El prueba busco evaluar la viabilidad técnica del método. Se desarrolló como sigue:

- Se remojo 1.4 kg de grano en la proporción de materia prima: agua es de 1:6 (w/v) por 12 horas a temperatura ambiente, al término se escurrió y pesó.
- Se llevo a cocción por 1 hora en la proporción de materia prima: agua 1:3 (w/v) . Cada 30 minutos se realizó cambio de agua (el tiempo empezó iniciada la ebullición) (Ver Figura 1.2).

- Se escurrió el agua de cocción que tuvo un color amarillo marfil de sabor muy amargo, con olor fuerte a tarwi crudo, mediante tamiz y balde (Ver Figura 1.2).



Figura 1.2. Cocción y escurrido del grano de tarwi

- Se lavó el grano en agua reposo en recipientes de plástico (baldes 10 Lt) y agua potable. La proporción de grano: agua fue de 1:3 (w/v). El lavado se realizó por un tiempo de 5 días a temperatura ambiente. Cada 24 horas se realizó cambio de agua y se recargó en la misma proporción. Se evaluó sensorialmente cada día el amargor del lupino. Luego se empacaron en bolsas PE en refrigeración hasta llevarlos a secar (Ver Figura 1.3).



Figura 1.3. Lavado y secado del grano del tarwi

- Se secó los granos a temperatura de 50°C por 18 horas colocando los granos en mallas del secador de bandejas. Los granos secos fueron almacenados en bolsas de PE hasta su molienda. (Ver Figura 1.3).
- La realizó el molido en molino de grano de café y tamizados para obtener harina fina. (Ver Figura 1.4).
- Se empaco en bolsas de PE con cierre hermético a temperatura ambiente hasta su análisis (Ver Figura 1.4).

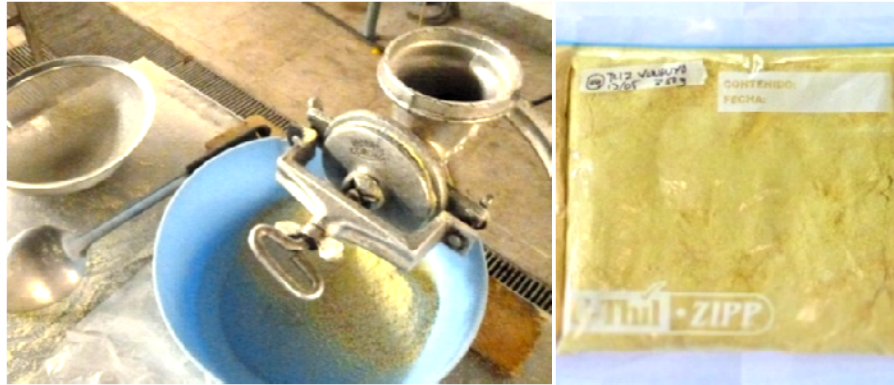


Figura 1.4 Molienda del grano de tarwi seco

RESULTADOS

- Las etapas de proceso fueron muy manejables por tanto la convierte en un método muy reproducible
- Se logró un desamargado imperceptible sensorialmente a los 5 días
- Se redujo la pérdida de agua en 75% cambiando el parámetro de cambio de agua de 6 por 24 horas lo que lo convierte en muy viable en costos.
- La ganancia de peso fue alrededor de 100 %, lo cual le agrega viabilidad económica porque el tarwi en su mayoría se vende en fresco.
- Se consideró buen método de Jacobsen y Mujica (2006) modificado para desamargar los 10 genotipos de lupino y evaluar su variación de componentes durante el proceso.

Cuadro 1.1 Variación de peso durante el proceso de desamargado de diez genotipos de lupino

N°	Genotipo	GANANCIA O PERDIDA DE PESO (kg)								
		Peso inicial	Remojo (12 hrs)	30 min cc	60 min cc	Lavado 1 (día 1)	Lavado 2 (día 2)	Lavado 3 (día 3)	Lavado 4 (día 4)	Lavado 5 (día 5)
1	COMP. BLANCO S.	1.4	3.10	3.33	3.32	3.57	3.57	3.54	3.54	3.54
2	ALTAGRACIA	1.4	3.30	3.25	3.21	3.30	3.38	3.29	3.29	3.29
3	MOTEADO BEIGE	1.4	3.20	3.16	3.16	3.21	3.27	3.32	3.30	3.32

ANEXO 02. PROCEDIMIENTOS ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH

METODOLOGÍA PARA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

POR EL MÉTODO DE DPPH, AOAC 2012

(Adaptación de Plank *et al.*, 2012)

1. FUNDAMENTO

El método se fundamenta en que el electrón desapareado del radical DPPH (radical libre) se aparea con el electrón donador de un antioxidante, entonces el DPPH se reduce, dando como resultado decoloración del DPPH de color púrpura a amarillo, siendo su máxima absorbancia a 517 nm. A diferencia del método convencional de DPPH, este método maximiza la eficiencia de extracción de antioxidantes por adición directa del estándar de DPPH sobre la muestra. Los compuestos antioxidantes son continuamente extraídos de la muestra por el metanol grado HPLC y en **simultáneo** reaccionan con el DPPH hasta que la extracción y reacción sea completa (Plank *et al.*, 2012).

El método descrito a continuación es una adaptación del metodología original de Plank *et al* (2012). Las variaciones observadas fueron determinadas por experimentación preliminar mostrada en el presente adjunto (ver pruebas preliminares)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima: Muestra en harina

2.2 Reactivos y Equipos: Trolox, DPPH, Metanol grado HPLC, Almidón de maíz, Agua desionizada, Agua destilada, Espectrofotómetro UV, Baño maria con agitación, Agitador magnético.

2.3 Métodos

2.3.1 Preparación de reactivos

Solución de DPPH (40 mg/L) : Se pesa 40 mg de DPPH en papel aluminio. Se transfiere luego a una fiola de 1 Lt y se añade 500 mL de metanol HPLC. Se cubre la fiola con papel aluminio y se deja agitar por 20 minutos (agitador magnético). Se retira el magneto y se añade 500 mL de agua desionizada. Se agita por otros 20 minutos en agitación magentica.

Se retira el magneto y se completa el volumen con metanol. Se agita un tercera vez por 10 minutos y se transfiere a un envase ambar u otro cubierto con papel aluminio. Se debe proteger esta solución de la luz en todas las etapas. Se debe hacer la solución para cada día, antes del análisis. *Nota: La solución DPPH es color morada, no almacenable.*

Standar de Trolox (50 mg/100mL): Pesar 50.00 ± 0.1 mg de trolox en papel aluminio. Luego transferir el polvo a una fiola de 100 mL y agregar 50 mL de metanol HPLC. Cubrir la fiola con papel aluminio y agitar con magneto por 5 minutos. Agregar 50 mL de agua desionizada. Agitar con magneto por 5 min y completar con metanol HPLC. Luego se transfiere el preparado a un tubo Falcom de 50 mL de capacidad. *Nota: La solución estándar de trolox es transparente y almacenable a 4°C por hasta 2 semanas cubierto con papel aluminio.*

2.3.2 Determinación de curva patrón

La curva patrón permite encontrar tres valores que se requieren para el cálculo final de actividad antioxidante y son:

- a) Pendiente Trolox: Pendiente de la ecuación de curva patrón, debe ser negativo
- b) Blanco Teórico.: Intercepto de la ecuación de curva patrón (absorbancia cercana a 1)
- c) Abs blanco: La mitad del intercepto de curva patrón

La curva debe tener un $R^2 > 0.99$ ploteando mg trolox/100 mL vs absorbancias y es como sigue:

- Se toma alicuotas de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mL del estandar stock de trolox (50 mg/100 mL) y se verte en tubos falcom de 50 mL de cap. (cada punto por triplicado).
- Se adiciona 25 mL de solución de DPPH
- Se cierra bien los tubos y se lleva a incubación en baño maría con agitación a 35°C por 2 horas.
- Se realiza la lectura a 517 nm previamente utilizando el blanco de agua destilada.

2.3.3 Determinación de actividad antioxidante

De los preliminares obtenidos la adaptación del procedimiento planteado por Plank *et al* (2012) es como sigue:

Mezclado: Se pesa 3 cantidades de muestra sin desextracto etéreo (20, 35 y 50 mg) mas almidón de maíz en proporción 1:9 w/w (180, 315 y 450 mg de almidón respectivamente) en 3 tubos Falcom de 50 mL de capacidad, se adiciona 25 mL de solución de DPPH para cada tubo. Se observa un cambio de color del DPPH (de lila a amarillo), mientras mas contenido antioxidante tiene la muestra, mas se decolora el DPPH, por tanto menos absorbancia.

Incubación: Para una completa extracción de componentes antioxidantes se cierra bien los tubos y se lleva a incubación en baño maría con agitación a 35°C por 2 horas. Los tubos son fijados con cinta a la base para evitar que los tubos floten.

Filtrado : Se filtra las muestras con papel filtro, recolectando los sobrenadantes en tubos de vidrio de 10 mL de capacidad previamente etiquetados.

Lectura : Se realiza la lectura a 517 nm en espectrofotometro UV, realizando primero la lectura del blanco que es agua destilada. Las muestras se leen dentro de los 30 minutos salido de la incubación.

Cálculos : El presente método es muy particular en comparación a otros análisis colorimétricos que solo requieren de curva patrón para su determinación. El conjunto de ecuaciones se muestra a continuación y un ejemplo de los mismos esta en el preliminar forma de de cálculo.

Para determinar la actividad antioxidante de la muestra en $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g m (bs)}$ se realizan los siguientes cálculos:

Se determina primero el peso corregido, la absorbancia neta y el Masa Blanco mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Peso corregido (g)} = \frac{\text{Peso muestra (mg)} \times \text{Factor de dilucion}}{1000}$$

Donde:

Factor de dilución es la mezcla muestra mas almidón de maíz (mg) y 1000 es el factor de conversión de mg a gr

$$\text{Abs neta} = \text{Blanco Teórico} - \text{Abs a 517 nm}$$

Donde:

Blanco Teorico es el intercepto de la curva patrón y la *Abs* a 517 nm es la absorbancia promedio de cada muestra.

$$\text{Masa Blanco (g)} = \frac{(\text{Abs blanco} - Y\text{intercepto})}{\text{Pendiente}}$$

Donde:

Abs blanco : determinado en curva patrón (mitad de Blanco Teorico)

Y intercepto y Pendiente: Intercepto y Pendiente de la ecuación peso corregido y absorbancia neta de la muestra

Finalmente se reemplaza datos en la ecuación expresada en base húmeda

$$AAT = \frac{\text{Factor Trolox} * \text{Abs Blanco}}{\text{Masa Blanco} * |\text{Pendiente Trolox}|}$$

Donde:

AAT = *Actividad Antioxidante Total* ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g muestra}$)

Factor Trolox : 391 546 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ (Plank et al., 2012)

Pendiente Trolox: pendiente de curva patron

3. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Plank D, Sz John, Sapirstein H, Woollard D, Zapf Ch, Lee V, Chen C, Hai R, Tsao R, Dusterloh A, Baugu S. 2012. Determination of antioxidant activity in Food and Beverages by reaction with 2,2'-diphenil-1-picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative study first action 2012.04. Journal of AOAC International. Vol. 95 (6). 1562-1569.

**FORMA DE CÁLCULO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
MÉTODO DE DPPH, AOAC 2012**

(Plank *et al.*, 2012)

Para una mejor comprensión de manejo de los datos con las ecuaciones establecidas por el método, fue necesario mostrar un ejemplo de como se utilizó los datos disponibles para la determinación de actividad antioxidante. En el presente ejemplo se muestra la determinación de actividad antioxidante del tarwi dulce:

Datos disponibles y/o requeridos

Curva Patrón Trolox

- Rango de curva : 0.2 - 1.0 mg trolox/100 mL (Abs de 0.653 a 0.164)
- Pendiente trolox = -1.254 abs /mg trolox (pendiente de curva patrón)
- Blanco teórico = 0.788 abs (intercepto de curva patrón)
- Abs Blanco = 0.394 abs (mitad del theoretical blank)

Muestra

- Tres pesos de muestra del tarwi dulce 20, 35 y 50 mg,
- Tres pesos de almidón 180, 315, 450 mg
- Tres Abs de lectura de muestra mas almidón 0.464, 0.335 y 0.234,

1. Determinación de peso corregido de muestra

$$\text{Peso corregido (g)} = \frac{\text{Peso muestra (mg)} \times \text{Factor de dilucion}}{1000}$$

$$\text{Peso corregido 1} = (20 \text{ mg} \left(\frac{20+180}{20}\right) \text{mg}) \left(\frac{1g}{1000 \text{ mg}}\right) = 0.2 \text{ g}$$

$$\text{Peso corregido 2} = (35 \text{ mg} \left(\frac{35+315}{35}\right) \text{mg}) \left(\frac{1g}{1000 \text{ mg}}\right) = 0.35 \text{ g}$$

$$\text{Peso corregido 3} = (50 \text{ mg} \left(\frac{50 + 450}{50}\right) \text{mg}) \left(\frac{1g}{1000 \text{ mg}}\right) = 0.5 \text{ g}$$

2. Determinación de absorbancia neta

$$Abs\ neta = Blanco\ Teorico - Abs\ a\ 517\ nm$$

$$Abs\ neta\ 1 = 0.788 - 0.464 = 0.314$$

$$Abs\ neta\ 2 = 0.788 - 0.335 = 0.443$$

$$Abs\ neta\ 3 = 0.788 - 0.234 = 0.544$$

3. Gráfica de Peso corregido Vs. Abs neta

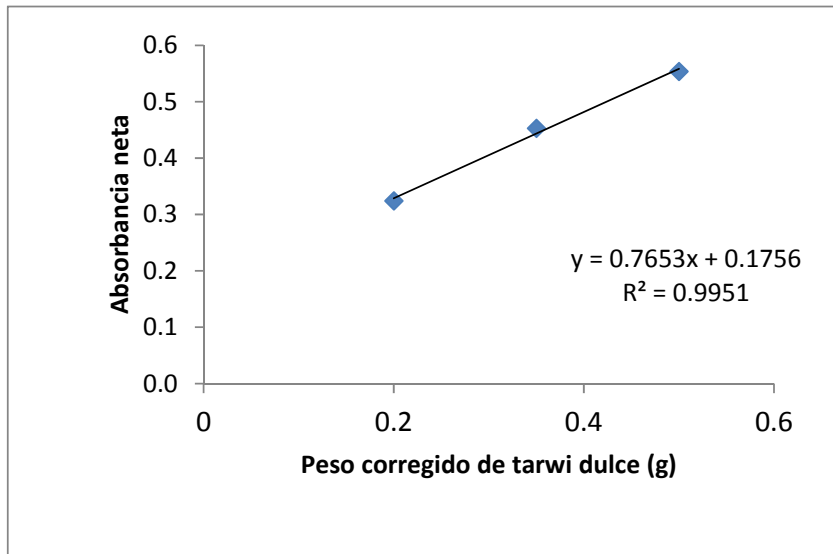


Figura 2.1. Curva de muestras

La curva de Peso corregido y Abs neta presenta pendiente positiva, esto indica que a mayor peso de muestra mayor diferencia entre el theorikal blank y la absorbancia de la muestra, es decir mayor efecto de decoloracion.

4. Determinación de Masa Blanco

De la curva Peso corregido y Abs neta se utilizan el intercepto = 0.175 y pendiente = 0.765 y el Abs blanco de la curva patron = 0.394 (mitad del blanco teorico)

$$Masa\ Blanco\ (g) = \frac{(Abs\ blanco - Yintercepto)}{Pendiente}$$

$$\text{Masa blanco (g)} = \frac{(0.394 - 0.175) \text{ abs}}{0.765 \text{ abs/g}} = 0.299 \text{ g de muestra}$$

5. Determinación de actividad antioxidante (AAT)

Con los siguientes datos: Trolox Factor = 391 546 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g muestra}$ (Factor provisto por Plank et al., 2012), Abs blanco = 0.394 abs, Masa blanco = 0.299 g y valor absoluto de Trolox pendiente = 1.254 abs /mg Trolox

$$AAT = \frac{\text{Factor Trolox} * \text{Abs Blanco}}{\text{Masa Blanco} * |\text{Pendiente Trolox}|}$$

$$\begin{aligned} AAT (bh) &= \frac{\left(391\,546 \mu\text{mol} \frac{ET}{100g \text{ Trolox}} \right) (0.394 \text{ abs})}{(0.299 \text{ g muestra}) \left(1.254 \frac{\text{abs}}{\text{mg Trolox}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg Trolox}}{1g \text{ trolox}} \right)} \\ &= 411.44 \mu\text{mol} \frac{ET}{100 \text{ g muestra}} \end{aligned}$$

Considerando la humedad de la muestra = 12%

$$AAT (bs) = 467 \mu\text{mol} \frac{ET}{100 \text{ g muestra}}$$

Todos los resultados de actividad antioxidante mostrados en el presente trabajo de investigación fueron tratados del mismo modo.

PRUEBAS PRELIMINARES DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
METODO DE DPPH, AOAC 2012

(Plank *et al.*, 2012)

1. Análisis de Metodología original

Se analizó la metodología planteada por Plank *et al* (2012) para identificar los parámetros que requerían adaptación. La descripción del método original es como sigue:

Reactivos: 2 Lt de reactivo DPPH (40 mg/L), 100 mL de trolox (0.5 mg/mL). La cantidad de DPPH permite trabajar 40 muestras.

Preparación de curva patrón: Se prepara una curva de 4 puntos en matraces de 125 mL (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg Trolox/100mL del standar de trolox, mas 50 mL de DPPH para c/u). Se incuba por 4 horas a baño maria con agitacion (35°C), se filtra y realiza la lectura a 517 nm con blanco de agua destilada.

Tratamiento de muestra: Se prepara 100 mg de muestra, 900 mg de almidón de maiz y 50 mL de DPPH en matraces de 125 mL. Se incuba en baño maria con agitación por 4 horas a 35°C, se filtra y se realiza la lectura a 517 nm con blanco de agua destilada

Resultados

Los factores que requerían adaptacion fueron:

- Cambio de envase de preparación: matraces de 125 mL por tubos falcom de 50 mL. Esto debido a que existió limitación de material (matraces) y equipos (agitador orbital) para trabajar en simultáneo un aproximado de 30 muestras.
- Reducción de cantidad de muestra: 100 mg de muestra por 50 mg. Esto es debido a que el tubo falcom solo tiene la capacidad optima para trabajar la mitad de mezcla de lo que dice el original.
- Reducción de cantidad de uso de DPPH: 50 mL de DPPH por 25 mL. Reducción debida a reducción de muestra (proporcional). Esto fue ventajoso ya que la cantidad de metanol HPLC fue limitado.

- Reducción de cantidad de tiempo de incubación: 4 horas por 2 horas. Reducción debida a reducción de muestra (proporcional). Esto fue ventajoso ya que no había mucha disponibilidad de equipo y laboratorios considerando 4 horas de incubación.
- Reducción de alícuotas para curva patrón: de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL a la mitad (0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mL). Debido al cambio de envase de preparación, mas las concentraciones se mantuvieron (0.2 - 0.8 mg Trolox/100 mL).

2. Prueba de cambio de envase de preparación

La prueba se desarrollo tanto para muestras y curvas patrón. La prueba buscó a) determinar si existe elevada variabilidad de absorbancias entre el uso de matraz de 125 ml y tubos falcom de 50 mL y b) determinar la Abs blanco de curva patrón y la Abs del peso sugerido.

- Reactivos: Se utilizó DPPH preparado para ese día (1 Lt).
- Prueba en Matraces: 100 mg de muestra, 900 mg de almidón de maiz. Para todos los casos se agregó 50 mL de DPPH. Se incubó por 4 horas en agitacion a baño maria (35°C). Se filtró y se realizó la lectura a 517 nm con blanco de agua destilada. Se evaluó por duplicado.
- Prueba en Tubos Falcom: 50 mg de muestra, 450 mg de almidón de maiz. Para todos los casos se agregó 25 mL de DPPH. Se incubó por 2 horas en agitacion a baño maria (35°C). Se filtró y se realizó la lectura a 517 nm con blanco de agua destilada. Se evaluó por duplicado.

Resultados



Figura 2.2. Prueba de cambio de envase de preparación



Figura 2.3. Efecto del contenido de antioxidante sobre el color del DPPH

Cuadro 2.1 Absorbancias de muestras en matraces y tubos Falcom

Muestra	Absorbancia 517 nm		Promedio	Desv Estándar	Coef Var (%)
	Matraz	Falcom			
Hojas sachá inchi	0.115	0.119	0.117	0.003	2.42
Semilla sachá inchi	0.108	0.107	0.108	0.001	0.66
Flor sachá inchi	0.100	0.095	0.098	0.004	3.63
Pepa de uva	0.108	0.099	0.103	0.006	5.82
Tarwi dulce inicial	0.202	0.210	0.206	0.006	2.92
Tarwi dulce desamargado	0.244	0.270	0.257	0.018	7.15

Al revisar los datos comparativos de muestras obtenidos en matraces y tubos Falcom del Cuadro 2.1 se observó que las absorbancias presentaron un coeficiente de variación máximo de 6%, es decir los tubos Falcom podrían reemplazar a los matraces para análisis de muestras también para curva patrón.

3. Prueba de curva patrón y peso de muestra base

Como se demostró que los tubos falcom son apropiados, la presente prueba se trabajó con dichos materiales. Se buscó determinar la Abs blanco de la curva patrón y también evaluar si el peso propuesto por el artículo lograba la decoloración del 50% del DPPH. Se realizó de la siguiente manera:

- **Reactivos:** Se preparó DPPH (40 mg/L) preparado para ese día (0.5 Lt) y trolox almacenándolo en refrigeración.

- *Preparación de curva:* Se extrajó 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mL de standar de trolox (50 mg Trolox/100 mL) a los tubos Falcom por duplicado, la concentraciones obtenidas fueron 0.2 - 0.8 mg Trolox/100 mL. Se adicionó 25 mL de DPPH (40 mg/L). Se llevó a incubacion-agitacion por 2 horas a 35°C. Se realizo la lectura en espectrofotómetro UV a 517 nm con blanco de agua destilada.

Resultados

Los resultados de Absorbancia para la curva patron se muestran en el cuadro 2.2 y la curva se observa en la Figura 2.4.

Cuadro 2.2 Absorbancias de curva patron de trolox

N°	Trolox (mL)	Abs Promedio
1	0.1	0.562
2	0.2	0.324
3	0.3	0.051
4	0.4	0.048

n=2

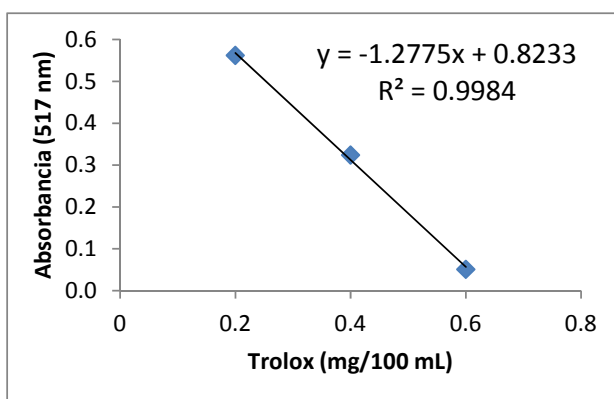


Figura 2.4. Curva patron de standar de trolox

Para la grafica solo se consideró 3 puntos para alcanzar así un $R^2 > 0.9$. El rango de absorbancias fue de 0 a 0.6. Se midió el DPPH inicial y se obtuvo un valor de 0.7 aproximadamente, eso quiere decir que la concentración de DPPH (40 mg/L) reportada por el método es baja para lograr una curva de 0 a 1 de Abs. Otros autores reportan

concentraciones de DPPH de 200 a 400 mg/L para lograr un rango de 0 a 1 (Galvez *et al.*, 2009; Martinez-Villaluenga *et al.*, 2009; Siger *et al.*, 2012). Los valores de curva patrón fueron:

Blanco teórico = 0.823 abs

Pendiente trolox = -1.277 abs/mg trolox

Abs blanco = $0.823 / 2 = 0.412$ abs

El valor de Abs blanco (0.4) fue superior a los valores de abs de las muestras obtenidas anteriormente (0.1 - 0.25) (Ver Cuadro 2.1); esto indica que el peso fue excesivo decolorando más del 50% del DPPH. Los próximos pesos de lupino debían ser menores para la determinación de actividad antioxidante.

4. Prueba de determinación de actividad antioxidante

Plank *et al* (2012) indican 3 pesos de muestra para la determinación de actividad antioxidante. En la prueba anterior se trabajó con 50 mg de muestra y se obtuvo valores de absorbancia inferiores (0.1 a 0.25) al valor de 50% de decoloración del DPPH (0.4) (Ver Figura 2.4). Entonces se redujo la cantidad de muestra para obtener absorbancias por encima del valor de 0.4. La prueba se desarrollo en tubos Falcom tanto curva y muestras.

- Reactivos: Se utilizó DPPH preparado nuevamente ese día (2 Lt) y trolox almacenado en refrigeración.
- Curva patrón: Se utilizó la curva patrón obtenido el día anterior
- Muestras: Se mezcló 20, 35 y 50 mg de muestra de tarwi dulce sin desamargar. Se adicionó 180, 315 y 450 mg de almidón respectivamente. Para las muestras de referencia se mezcló 10, 20 y 50 mg (sacha inchi hoja, sachá inchi semilla, sachá inchi flor y pepa de uva). Se adicionó 90, 180 y 450 mg de almidón respectivamente. Se agrego 25 mL de DPPH a cada tubo Falcom. Se tapó, se incubó por 2 horas a 35°C en baño maría con agitacion, se filtró y se realizó la lectura a 517 nm con blanco de agua destilada. Se realizó todo por triplicado.

Resultados de pruebas

Las lecturas de absorbancias, peso corregido y Absorbancias netas tanto del tarwi y muestras de referencia se muestran en los Cuadros 2.3 Y 2.4 (VER FORMA DE CÁLCULO).

Los datos de curva patrón utilizados fueron:

Blanco teórico = 0.823 abs

Pendiente trolox = -1.277 abs/mg Trolox

Abs blanco = $0.823 / 2 = 0.412$ abs

Cuadro 2.3. Absorbancias de tarwi dulce

Peso (mg)	Tarwi Dulce (Abs 517 nm)	Peso corregido (g)	Abs neta
20	0.464	0.2	0.359
35	0.335	0.35	0.488
50	0.234	0.5	0.589

Cuadro 2.4. Absorbancias de muestras de referencia

Peso (mg)	Absorbancias a 517 nm				Peso Correx (g)	Absorbancia neta			
	SACHA INCHI HOJAS	SACH INCH SEMILLA	SACHA INCH FLOR	PEPA UVA		SACHA INCHI HOJAS	SACH INCH SEMILLA	SACHA INCH FLOR	PEPA UVA
10	0.465	0.449	0.416	0.443	0.1	0.358	0.374	0.407	0.380
20	0.341	0.331	0.327	0.333	0.2	0.482	0.492	0.496	0.490
50	0.125	0.121	0.090	0.112	0.5	0.698	0.702	0.733	0.711

Se observó tanto para el Tarwi y muestras de referencia que los pesos utilizados reportan absorbancias no muy esperadas en plenitud, ya que lo ideal es que el peso intermedio logre una abs target y los otros dos por encima y por debajo de ese valor. En la prueba se observó que el peso inferior logró una Abs ligeramente superior al abs target. Se determinó los Pesos corregidos Vs Abs neta, se graficó los mismos y se obtuvo las pendientes e

interceptos de las curvas de muestras analizadas (Ver Cuadro 2.5). Considerando la Abs target de 0.412 obtenido de curva patron en tubos Falcom, el target mass para las muestras se muestra en el Cuadro 2.5. (Ver preliminar forma de cálculo).

Cuadro 2.5. Valores de curva patron de tarwi y muestras de referencia

Muestra	Intercepto	Pendiente	Masa Blanco
Tarwi dulce	0.412	0.21	0.765
Sacha Inchi hoja	0.412	0.294	0.82
Sacha Inchi semilla	0.412	0.311	0.792
Sacha Inchi flor	0.412	0.329	0.809
Pepa de uva borgoña	0.412	0.311	0.638

Finalmente los valores de actividad antioxidante de las muestras analizadas se muestran en el cuadro 2.6. (Ver forma de cálculo).

Cuadro 2.6. Actividad Antioxidante Total de muestras analizadas (TAA)

	Total actividad antioxidante (TAA)				
	TARWI DULCE	HOJAS	SEMILLA	FLOR	PEPA UVA
TAA ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$) bh	479.01	880.52	994.31	1237.25	1013.14
Humedad (%)	12.00	12	13	21	22
TAA ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$) bs	544.33	1000.59	1142.88	1566.14	1298.90

Del cuadro 2.6 se observa que el tarwi dulce presentó una actividad antioxidante 544.33 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ muestra, dentro los valores encontrados por Galvez *et al* (2009) y Siger *et al* (2012) de 142 a 678 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ muestra bs, lo que indica que los pesos utilizados (20, 35 y 50 mg) para el lupino son aplicables. Las muestras de referencia (sacha inchi y pepa de uva) reportaron valores de acuerdo a la bibliografía, lo que valida el procedimiento efectuado y también los pesos utilizados para los análisis de todos los ecotipos de lupino.

ANEXO 03. PROCEDIMIENTOS DE PROTEÍNA SOLUBLE POR BRADFORD

El presente anexo está dividido en 3 segmentos: metodología, forma de cálculo y pruebas preliminares del análisis.

METODOLOGÍA DE PROTEÍNA SOLUBLE POR BRADFORD

(Adaptación de Bradford, 1976 por Sathe *et al.*, 2012 y Thermo Scientific, s/a)

1. FUNDAMENTO

Según Zaia *et al* (1998) el método de Bradford es una técnica para la determinación de proteínas totales que utiliza el colorante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método está basado en la interacción entre el colorante BG-250 y las macromoléculas de proteína que contiene aminoácidos de cadenas laterales básicas o aromáticas. El colorante, en solución acida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción molar mayor que el colorante libre. En medio ácido, la interacción entre la proteína de alto peso molecular y el colorante BG-250 provoca un rompimiento del equilibrio del colorante para la forma aniónica. El colorante se degrada y disminuye su color. A menor absorbancia mayor contenido de proteína. La longitud de onda de mayor absorción es de 595 nm.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Materia Prima: Harina de lupino desgrasada

2.2 Reactivos y Equipos: Cloruro de sodio (GR); Reactivo Bradford (liquido de color marrón oscuro en botella de plástico almacenado en refrigeración); Proteína Bobino Sérico Albumina, BSA (Polvo color blanco); Lector de micropozos; Agitador orbital; Centrifuga de 15000 rpm con control de temperatura; Vortex; Balanza analítica.

2.3 Métodos

2.3.1 Preparación de reactivos

Solución de NaCl (1M): Se prepara 14,68 g de NaCl (GR) con agua destilada en una fiola de 250 mL (Considerando PM del NaCl = 58.44 g/mol y su concentración de 95.5%) Se almacena a temperatura ambiente (Concentración optima reportada por Sathe *et al.*, 2012).

Suero Fisiológico, 0.9% (w/v): Se pesa 0.9 g de cloruro de sodio y se enraza en fiola de 100 mL de agua destilada (Concentración indicada por Thermo Scientific, s/a). Se almacena a temperatura ambiente.

Standar de Proteina Bovino Sero Albumina BSA, 2mg/mL (w/v): Se pesa 20 mg de BSA y se enraza en un fiola de 10 mL con suero fisiológico (0.9%). Se divide en 10 tubos ependorf de 1.5 mL de capacidad. Cada tubo permite la obtención de una curva patrón. (Concentración indicada por Thermo Scientific, s/a). Se almacena en congelación.

2.3.2 Determinación de curva patrón

La curva se elabora de acuerdo a lo señalado por Thermo Scientific (s/a) para obtener una curva de 8 puntos en un rango de 100 a 2000 ug de BSA/mL solución (Ver Cuadro A-3.1 Solo se requiere de un vial de standar de BSA (1 mL) para preparar toda una curva. Se prepara cada punto en tubos ependorf de 1.5 mL.

Cuadro 3.1: Estándares de Proteina BSA para obtención de curva patrón
(rango de 0 a 2000 ug/ml)

Vial	Nacl (1 M)	BSA (2mg/mL)	Concentración final de BSA
A	0	300 ul de stock	2000 ug/ml
B	125ul	375 ul de stock	1500 ug/ml
C	325ul	325 ul de stock	1000 ug/ml
D	175ul	175 ul de dilución del vial B	750 ug/ml
E	325ul	325ul de dilución del vial C	500 ug/ml
F	325ul	325 ul de dilución dell vial E	250 ug/ml
G	325ul	325 ul de dilución del vial F	125 ug/ml
H	400 ul	100 ul de dilución del vial G	25 ug/ml
I	400ul	0	0 ug/ml = Blanco

Fuente: (Thermo Scientific, s/a).

Una vez tenido los 8 puntos el protocolo de lectura es como lo describe Thermo Scientific (s/a):

Mezclado: Se mezcla 5 uL de extracto de muestra y 250 ul de Reactivo de Coomassie directo en los pozos de la placa micropozos. Es fundamental la hoja de registro de ensayo

ya que evita errores de ubicación y agiliza el llenado de la placa. Al adicionar el reactivo Coomassie el cambio de color es instantáneo de marrón oscuro a azul.

Lectura: Se mide la absorbancia a 595nm en lector de micropozos restando el blanco (Blank = 5 uL de NaCl 1M + 250 uL de Reactivo Coomassie). Se elabora la curva ug BSA/mL vs. Absorbancia a 595 nm. La grafica debe cumplir la ley de Beer de linealidad ($R^2 > 0.9$) de concentracion vs. Absorbancia.

2.3.3 Preparación de muestra

Se requiere extracto acuoso de muestra para seguir el protocolo citado por Thermo Scientific (s/a). La adaptación de Sathe *et al* (2012) de preparación de muestra es como sigue:

Mezclado: Harina desgrasada: NaCl (1M) de 1:10 (w/v): Se pesa 100 mg de muestra de lupino desextracto etéreo en un tubo ependorf de 1.5 mL. Luego se agrega 1 mL de NaCl (1M). Se agita con un vortex hasta lograr dispersión (Se realiza por triplicado). El NaCl permite el incremento de pH por encima del pI y solubiliza la proteína.

Agitación: Los tubos se llevan a agitación en un agitador orbital por 30 minutos. Se mantienen fijos con cinta masking tape. Este reposo en agitación permite la Rxn total de solubilización proteica (complejo proteína-colorante color azul).

Centrifugación: Los tubos son llevados a centrifugación a 15000 rpm, por 30 minutos a 4°C (No requiere contrapesado o pesar otra vez ya que los pesos son iguales, $ds = \pm 0.1$). La centrifugación permite la obtención del sobrenadante rico en proteína soluble.

Almacén: Se separa el sobrenadante en tubos de vidrio de 1 mL de capacidad y se almacena en refrigeración.

2.3.4 Determinación de proteína soluble

De acuerdo al protocolo mencionado por Thermo Scientific (s/a) el procedimiento es como sigue:

Mezclado: Se mezcla 5 uL de extracto de muestra y 250 ul de Reactivo de Coomassie directo en los pozos de la placa micropozos.

Lectura: Se mide la absorbancia a 595nm en lector de micropozos restando el blanco (Blank = 5 uL de NaCl 1M + 250 uL de reactivo Bradford).

Cálculos: El procedimiento de cálculo para determinación de proteína soluble de las muestras g proteína/100 g muestra (bs).es:

- *Proteína de acuerdo a la curva:* Reemplazar la absorbancia obtenida en la ecuación de la curva patrón y obtener la concentración de cada una. Donde “y” es Abs y “x” es la concentración (ug/mL).
- *Proteína en base al extracto:* Multiplicar resultado por el volumen del extracto de muestra y los factores de dilución. El resultado sigue en mg/mL.
- *Proteína en base a la muestra:* Reemplazar la cantidad de muestra (g) que hay en 1 mL de extracto, realizar las conversiones y el resultado se expresa en g/100 g muestra (bh). Para el resultado final transformar a base seca y agregar la extracto etéreo que fue extraída.

3. REFERENCIAS

- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive metho for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72. 248-254
- Sathe S, Kshirsagar H, Sharma G. 2012. Solubilization, Fractionation, and Electrophoretic Characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.) Proteins. Journal Plant Foods Hum Nutr. 67: 247-255.
- THERMO SCIENTIFIC. s/a. Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit. Consultado el 03 mayo de 2013. Disponible en el <http://www.piercenet.com/instructions/2160129.pdf>
- Zaia D, Zaia C, Lichtig J. 1998. Determinacao de proteinas totais via espectrometría: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. J. Quimica Nova. 21(6).

FORMA DE CÁLCULO DE PROTEINA SOLUBLE POR BRADFORD

(Bradford, 1976; Sathe *et al.*, 2012; Thermo Scientific, s/a)

Para una mejor comprensión de manejo de los datos con las ecuaciones establecidas por el método, fue necesario mostrar un ejemplo de cómo se utilizó los datos disponibles para la determinación de proteína soluble. En el presente ejemplo se mostro la determinación de proteína soluble de tarwi H6:

Datos disponibles y/o requeridos

Curva Patrón $Y = 0.0008x + 0.0389$

Muestra - Abs Blanco $Abs\ H6 = 0.325$

1. Proteína de acuerdo a la ecuación patrón

Reemplazar la absorbancia obtenida en la ecuación de la curva patrón y obtener la concentración de cada una (ug/mL).

$$0.325 = 0.0008 (x) + 0.0389$$
$$x = 357.9\ \text{ug/mL} = 0.3579\ \text{mg/mL}$$

2. Proteína en base al extracto

Multiplicar resultado (mg/mL) por el volumen del extracto inicial y luego por el factor de dilución al que fue sometido (1 es el volumen de extracto de muestra, 80 es el Fd de la tercera dilución). El resultado sigue en mg/mL

$$(0.3579) (1/1) (80) = 28.63\text{mg/mL}$$

3. Proteína en base a la muestra

Reemplazar la cantidad de muestra que hay en la cantidad de extracto inicial. Para el presente trabajo se preparó 100 mg en 1 mL de NaCl. Se realiza las conversiones respectivas y se expresa en base a 100 g de muestra (bh)

$$\begin{aligned} \text{Soluble Protein} &= \frac{28.63 \text{ mg}}{\text{mL}} = \frac{28.63 \text{ mg}}{0.1 \text{ gm}} = \frac{28.63 \text{ mg}}{0.1 \text{ gm}} \left(\frac{1000}{1000} \right) = \frac{2863 \text{ mg prot}}{100 \text{ g muestra}} \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) \\ &= \frac{28.63 \text{ g prot}}{100 \text{ g muestra}} \end{aligned}$$

Es decir la muestra de lupino H6 sin desamargar desextracto etéreo presenta un contenido de proteína soluble de 28.69 % (bh). Considerando su humedad (12%) y contenido de extracto etéreo (30.47%) el contenido de proteína en base seca del lupino H6 es como sigue:

Incluyendo humedad

$$\begin{aligned} \text{Si} \quad 28.63 \% \text{ prot} &\text{ ———— } (100-12)\% \text{ ms} \\ x &\text{ ———— } 100 \% \text{ ms} \\ x &= 32.54\% \text{ de proteína (bs)} \end{aligned}$$

Incluyendo extracto etéreo

$$\begin{aligned} \text{Si} \quad 32.54 \% \text{ prot} &\text{ ———— } (100-20.47)\% \text{ ms} \\ x &\text{ ———— } 100 \% \text{ ms} \\ x &= 40.91 \% \text{ de proteína} \end{aligned}$$

Incluyendo humedad y extracto etéreo la cantidad de proteína soluble del lupino H6 crudo fue de 41%

PRUEBAS PRELIMINARES DE PROTEINA SOLUBLE POR BRADFORD

(Bradford, 1976; Sathe *et al.*, 2012; Thermo Scientific, s/a)

1. Análisis de Metodología original

Se analizó la metodología planteada por Bradford (1976) para identificar los parámetros que requerían adaptación. La descripción del método original es como sigue:

Reactivos: Reactivo Bradford (Coomassie azul brillante G-250, 0.01%); Bovino Sero Albumina ($\epsilon_{280}^{1\%} = 6.6$), Buffer NaCl (0.15M).

Preparación de curva patrón: Se prepara varios puntos en un rango de concentración de 1 a 10 ug de proteína (BSA mas buffer) se adiciona 1 mL de reactivo Coomassie, se agita y se lee en cubetas de 1 mL a 595 nm con un blanco de buffer mas reactivo.

Tratamiento de muestra: Bradford (1976) no menciona el tratamiento de muestra.

Resultados

- Reactivos ya preparados: Bradford (1976) prepara los reactivos, para el presente trabajo ya se disponía de solución Bradford de fabrica y solución BSA (2 mg/mL), respecto al Buffer Bradford (1976) trabajó con buffer NaCl (0.15 M) para la curva patrón, Sathe et al (2012) reportaron NaCl (1M) para preparación de la muestra de sachá inchi por tanto se tenía que probar el uso de estos nuevos reactivos para el lupino.
- Metodología de curva no adecuada para micropozos: El metodo planteado por Bradford (1976) es mas para espectrofotómetro UV, sin embargo Thermo Scientific (s/a) realizó una adaptación de Bradford (1976) para micropozos pero requirió ser probado.
- Ausencia método de preparación de muestra: Bradford (1976) y Thermo Scientific (s/a) no realizaron preparación de muestra, por lo que se adaptó un método de preparación de muestra de sachá inchi (Sathe *et al.*, 2012). Dicha metodología debió ser probada para el Lupino.

2. Prueba de determinación de curva patrón BSA

La prueba buscó reproducir la curva patrón BSA indicada por Thermo Scientific (s/a). La curva debió cumplir la Ley de Beer (linealidad con $R^2 > 0.9$). La prueba se realizó de la siguiente manera:

Preparación de puntos de curva: De un tubo ependorf que contiene 1 mL de BSA (2mg/mL) se tomó 3 alícuotas y de allí realizaron las demás diluciones para los demás puntos. Todos los puntos fueron preparados en tubos ependorf de 1.5 mL de cap. Luego se agregó el diluyente de NaCl (1M) según las cantidades indicadas en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Metodología de preparación de curva patrón BSA

Vial (Tubo Epdf)	NaCl (1 M)	BSA (2mg/mL)	Concentración final de BSA
A	0	300 ul de stock	2000 ug/ml
B	125ul	375 ul de stock	1500 ug/ml
C	325ul	325 ul de stock	1000 ug/ml
D	175ul	175 ul de dilución del vial B	750 ug/ml
E	325ul	325ul de dilución del vial C	500 ug/ml
F	325ul	325 ul de dilución del vial E	250 ug/ml
G	325ul	325 ul de dilución del vial F	125 ug/ml
H	400 ul	100 ul de dilución del vial G	25 ug/ml
I	400ul	0	0 ug/ml = Blanco

Mezclado: 5uL de cada extracto más 250 uL de Reactivo Bradford. Las mezclas se realizaron en la misma placa de micropozos. Los 5uL se extrajeron con micropipeta 100 uL de cap y el reactivo Comassie con micropipeta multicanal debido a que son varios pozos y el reactivo es inestable.

Lectura: Se realizó la lectura en el lector de micropozos a 595 nm con sustracción de blanco (NaCl 1M más reactivo Bradford) en el lector de micropozos

Resultados

Cuando se realizo el mezcla de solución de BSA mas Reactivo Bradford se observó la formacion del complejo proteína-colorante azul (Ver Figura 3.1). A mayor concentración de proteína en el extracto la coloracion viraba de tono oscuro marron a azul palido.

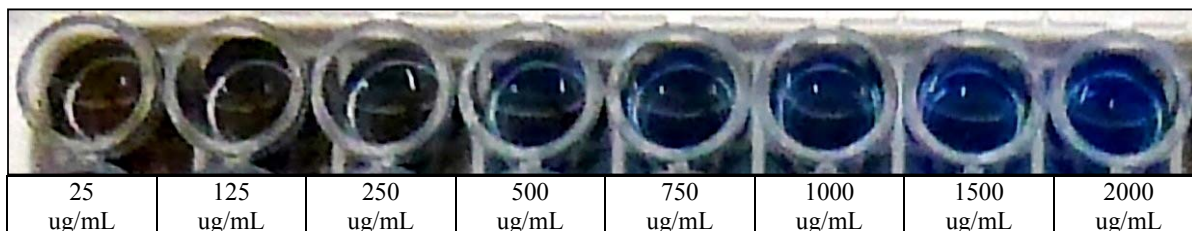


Figura 3.1. Reacción complejo proteína-colorante (BSA-Coomassie)

Los resultados de absorbancia obtenido de la curva patrón se muestran en el Cuadro 3.3

Cuadro 3.3. Absorbancias de puntos de curva patrón

BSA (ug/mL)	REPETICION			Promedi	Desv	Coef Var (%)
	R1	R2	R3			
0				0,0000		
25	0,012		0,039	0,0255	0,019	74,870
125	0,128	0,139	0,14	0,1357	0,007	4,908
250	0,207	0,209	0,221	0,2123	0,008	3,566
500	0,453	0,452		0,4525	0,001	0,156
750	0,637	0,635		0,6360	0,001	0,222
1000	0,875	0,743	0,78	0,7993	0,068	8,518
1500	0,927	0,937	0,86	0,8000	0,042	5,234
2000	1,137	1,13		1,1335	0,005	0,437

Algunos puntos del Cuadro 3.3 fueron eliminados para minimizar la variabilidad de las repeticiones. La curva mostrada en la Figura 3.2. fue obtenida solo en el rango de 250 a 1000 ug/mL con absorbancias de 0.2 a 0.8 y $R^2 = 0.99$, lo cual respecta la ley de Beer (linealidad y cruce en cero)

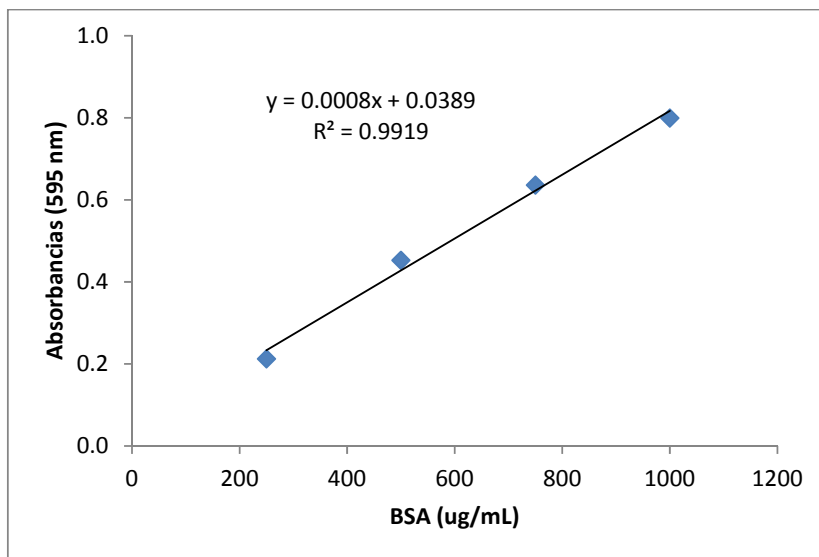


Figura 3.2. Curva patrón de BSA para determinar proteína soluble

Con dichos resultados se puede afirmar que la metodología planteada por Thermo Scientific (s/a), el Reactivo de Bradford preparado, la solución BSA (2 mg/mL) y el NaCl (1 M) permiten la obtención de una curva de proteína BSA aplicable para determinación de Proteína.

3. Prueba de preparación de muestra y lectura

La siguiente prueba tuvo como objetivo conocer la preparación de extracto de muestra reportado por Sathe *et al* (2012) y evaluar varias diluciones de extracto para obtener una absorbancia que este dentro del rango de la curva patrón ese mismo día. La prueba se desarrolló de la siguiente manera:

- Mezcla de 100 mg de muestra desgrasada de lupino H6 y 1 mL de NaCl (1M) en tubo ependorf de 1.5 mL de cap. Se disperso con el vortex.
- Medición de pH. Según Sathe et al (2012) la proteína soluble disminuye a pH 4. Para la prueba de pH se utilizo 2 g de muestra desextracto etéreda con 20 mL de NaCl (1 M) por triplicado.
- Agitación de muestras en agitador orbital por 30 min (Ver Figura A-3.3)



Figura 3.3. Agitación de muestras

- Centrifugación a 15000 rpm por 30 min a 4°C y separación de sobrenadante en tubos de vidrio (extracto de muestra).
- Se evaluó 3 diluciones del extracto de muestra (inicial, 1:10, 1:40 y 1:80) con el fin de que la absorbancia este en el rango de la curva estándar (Ver Figura 3.4). Se optó por el esquema mostrado en la Figura 3 para utilizar la menor cantidad de sobrenadante y porque la cantidad de extracto requerido es pequeño. Las diluciones se prepararon en tubos epenforf de 1.5 mL de cap.

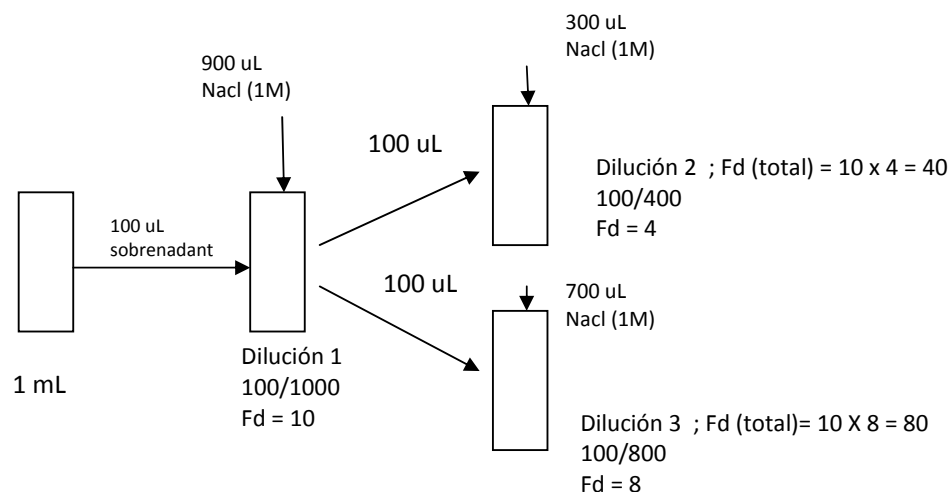


Figura 3.4. Esquema de preparación de diluciones de muestras

- Se extrajo 5uL de cada extracto y se adiciono 250 uL de Reactivo Bradford. Las extracciones se prepararon en la misma placa de micropozos. Los 5μL se extrayeron

con micropipeta 100 μ L de cap y el reactivo Bradford con micropipeta multicanal debido a que el colorante es inestable.

- Se realizó la lectura 595 nm con sustracción de blanco (NaCl 1M mas reactivo Bradford) en el lector de micropozos

Resultados

Referido a la medición de pH, se obtuvo un pH promedio de 6.0 para los extractos de lupino H6. Aunque se conoce que la solubilidad disminuye a pH 4.0 Sathe et al (2012) reportan que no hay diferencia significativa de proteína soluble a diferentes pH (1- 12) con buffer NaCl, por tanto no requiere para próximos análisis la medición de pH.

Respecto a la centrifugación se encontró que los pesos antes de ingreso a centrifuga fueron iguales (sd = \pm 0.1) por tanto no requiere realizar contrapesado de los tubos, simplemente colocarlos en centrifuga.

Respecto a la dilución resultó lo siguiente:

Cuadro 3.4. Absorbancias de muestras de lupino H6 inicial y desamargado

	DILUCION	Absorbancias a 595 nm		Proteina soluble (g/100 g m)bs	
		Inicial*	Desamargada*	Inicial	Desama
	INICIAL	1.834	1.0980	-	-
1	1: 10	1.374	0.7460	-	-
2	1: 40	0.872	0.5130	72.4	10.9
3	1: 80	0.622	0.5007	30.3	9.1

* n = 3

Como la curva patron presenta un rango de 0 a 1 de absorbancia, solo se consideraron las diluciones 2 y 3 (1:40 y 1:80 respectivamente). Sin embargo al final se decidió la dilución 3 ya que permitió valores de proteína soluble de 30.3% menor que la proteína cruda de 41.3 % para semilla inicial y 9.1 % de proteína soluble comparado con 50.3 % de proteína cruda de semilla desamargada. Respecto al último, es posible que las proteínas solubles después del proceso de desamargado se hayan desnaturalizado en el proceso térmico

sufrido en el desamargado y su contenido de nitrógeno pasó a formar parte del incremento de la proteína cruda.

El momento colocar los 5 μL a la placa solo se observó como una gota casi imperceptible. Según el manual de instrucciones para el Kit Comassie (Thermo Scientific, s/a) indica que se pudo haber utilizado hasta 10 μL con 250 μL de reactivo, sin embargo aunque con dificultad se logró obtener resultados esperados de reacción de color (Ver Figura 3.5).

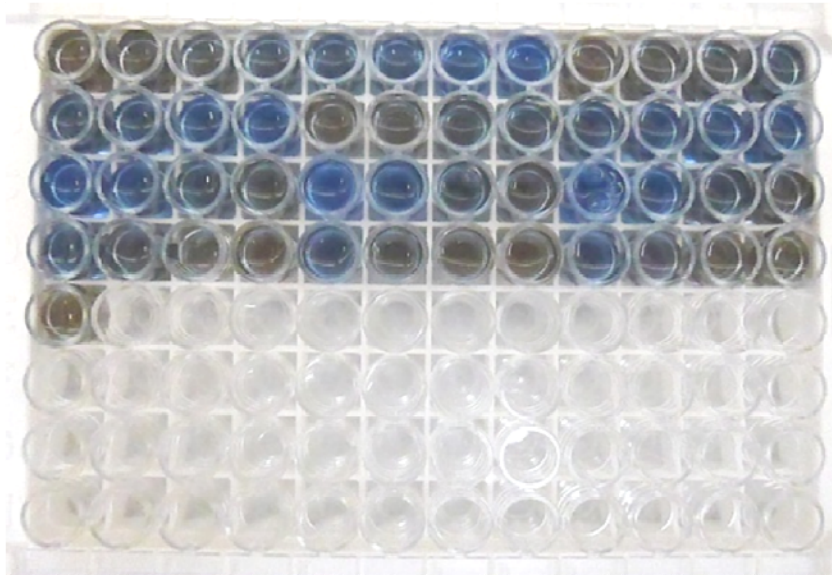


Figura 3.5. Muestras en la placa de lector de micropozos

De los resultados obtenidos se pudo afirmar que la metodología planteada por Sathe *et al* (2012) pudo ser aplicada para la preparación de muestra del lupino y con las modificaciones encontradas para ser aplicada para el resto de análisis de lupino.

ANEXO 04. PROCEDIMIENTOS DE CARBOHIDRADOS Y OLIGOSACARIDOS POR FENOL ACIDO SULFURICO

El presente adjunto está dividido en 3 segmentos: metodología, forma de cálculo y pruebas preliminares del análisis.

METODOLOGIA DE DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y OLIGOSACÁRIDOS POR METODO FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO EN LECTOR DE MICROPOZOS

(Metodología adaptada de Saha y Brewer, 1994; BeMiller, 2010;
Masuko et al., 2005 y Pinto s/a)

1. FUNDAMENTO

El fundamento es la destrucción de carbohidratos por la presencia de ácido (H_2SO_4) en medio caliente. Primero se da una deshidratación de azúcares y formación de varios derivados del furano. Esos productos luego son condensados gracias a los compuestos fenólicos (fenol, resorcinol, orcinol entre otros) dando como resultado un color marrón (Ver Figura 4.1); esto se mide en el espectrofotómetro a 490 nm (BeMiller, 2010).

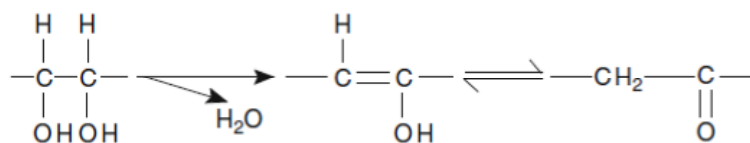


Figura 4.1. Esquema de reacción fenol ácido sulfúrico

Virtualmente toda clase de azúcares, incluyendo azúcares derivados, oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados con el método fenol ácido sulfúrico (BeMiller, 2010). Entonces, con el método fenol ácido sulfúrico basta una curva de glucosa para determinar el contenido de carbohidratos totales. Saha y Brewer (1994) reportan un estudio que permite determinar oligosacáridos en forma específica bajo el mismo método. Señalan que una curva de mezcla de dos hexosas (manosa y galactosa, 1:1) presentan similar perfil

que un estándar de oligosacáridos a diferentes diluciones. En el estudio de leguminosas como el lupino es importante el estudio de oligosacáridos ya que son compuestos no ventajosos para el organismo.

4. MATERIALES Y METODOS

2.1 Materia Prima: Harina de lupino desgrasada

2.2 Reactivos y Equipos: Ácido sulfúrico concentrado (98.8%); fenol (GR, cristales); etanol (99.9%); glucosa anhidra (polvo), manosa anhidra (polvo); galactosa anhidra (polvo); lector de micropozos; agitador orbital; baño maria, rotavapor.

2.3 Métodos

2.3.1 Preparación de reactivos

Solución de Fenol al 5% (w/w): Se prepara 0.5 g de fenol grado reactivo en una fiola de 10mL con agua destilada. Se cubre con papel aluminio y se almacena en refrigeración. (Adaptado de Saha y Brewer, 1994). El fenol se prepara en el instante ya que es muy inestable a degradación, además es poca cantidad la que se requiere para una muestra.

Solución stock de glucosa (10 mg/mL): Se prepara 1 g de glucosa en una fiola de 100 mL con agua destilada. Se cubre con papel aluminio y se almacena en refrigeración. (metodología adaptada de Saha y Brewer, 1994; BMiller, 2010; Masuko et al., 2005 y Pinto s/a).

Solución stock de mezcla manosa:galactosa (5 mg/mL): Se prepara 0.25 g de manosa y 0.25 g de galactosa en una fiola de 100 mL con agua destilada. Se cubre con papel aluminio y se almacena en refrigeración. (metodología adaptada de Saha y Brewer, 1994).

Etanol al 80% (v/v): Se prepara 800.8 mL de etanol concentrado en una fiola de 1 Lt con agua destilada (concentración inicial del etanol es 99.9%).

2.3.2 Determinación de curva patrón GLUCOSA Y MANOSA:GALACTOSA

Se prepara las curvas como se muestra en los Cuadros 4.1 y 4.2 en tubos ependorf de 1.5 mL .(metodología adaptada de Saha y Brewer, 1994; BMiller, 2010; Masuko *et al.*, 2005 y Pinto s/a).

Cuadro 4.1. Preparación de curva de Glucosa

Glucosa (mg/mL)	Standar de Glucosa (uL)	Agua Destilada (uL)
0	-	1000
1	100	900
2	200	800
4	400	600
6	600	400
8	800	200
10	1000	-

Cuadro 4.2. Preparación de curva de Manosa : Galactosa

Man:Gal (mg/mL)	Estándar de Manosa:Galactosa (uL)	Agua Destilada (uL)
0	-	1000
1	200	800
2	400	600
3	600	400
4	800	200
5	1000	-

Según Masuko et al (2005) una vez tenido los estándares el protocolo de lectura para cada punto es como sigue:

Mezclado: Se mezcla 50 µL de extracto, 150 µL de ácido sulfúrico concentrado y 30 µL de fenol en un tubo ependorf de 250 uL.

Incubación: Se lleva a baño maría por 5 min. (Adaptación: Es importante que el tiempo de incubación sea tomado a hornilla apagada una vez llegado a ebullición).

Lectura: Se extrae 150 µL del incubado y se deposita en la placa micropozos. Se realiza la lectura de 490 nm restando blanco (agua destilada, acido y fenol). Entre la salida de la incubación y lectura no debía pasar 15 minutos. La grafica debe cumplir la ley de Beer de Abs de 0.2 a 0.8, interseca en cero y $R^2 > 0.9$

2.3.3 Preparación de muestra

Para la obtención de extracto acuoso de la muestra, se sigue el procedimiento adaptado de Neiva-Zanette (2005) y BeMiller (2010) y es como sigue:

Mezclado: Se mezcla 100 mg de harina desgrasada y 30 mL de etanol (80%) en erlenmeyer de 125 mL y se agita hasta disolver (Neiva y Zanette, 2005). Se tapa con parafilm hasta el momento de la extracción.

Extracción: Se lleva a baño maría por 30 minutos a temperatura ebullición del etanol (75°C) (Adaptado de Neiva y Zanette, 2005; AOAC 922.02. 3.1.02). Se aplica el sistema REFLUJO para evitar la pérdida de etanol (Ver Figura 4.2).

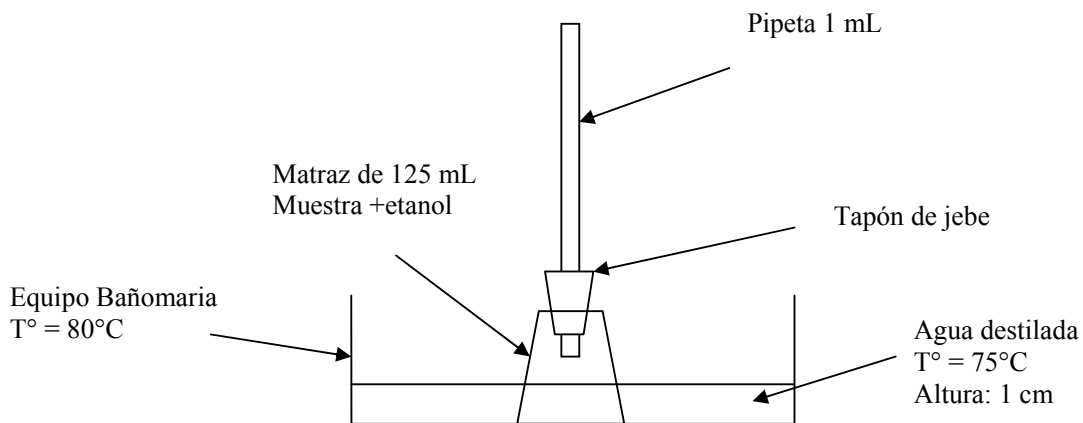


Figura 4.2. Esquema de principio del sistema reflujo (El etanol evaporado (burbujas) se condensa en la pipeta y vuelve al matraz)

Filtrado: Se filtra con papel filtro estandar. El residuo solido se diluye otra vez en 20 mL de etanol y extrae una vez más (Adaptado de BeMiller, 2010). Los filtrados se juntan y vienen a ser el extracto etanólico (EET). Se almacena en tubos falcom de 50 mL de capacidad, tapados y en refrigeración

Recuperación del etanol: Para obtener solo extracto acuoso de la muestra se elimina el etanol en rotavapor a 40°C y 73 - 77 mb (Parámetros de rotavapor). Se concentra hasta lograr la pérdida del 80% de volumen (etanol) y que quede solo el extracto acuoso de 20%. En caso de obtener menos del 20% las diferencias son completadas con agua destilada.

Almacenamiento: los extractos acuosos de muestras se almacenan en tubos falcom, cerrados y en refrigeración hasta su utilización. Es necesario realizar las diluciones de muestra para mejores resultados.

2.3.4 Determinación de carbohidratos totales y oligosacáridos

El protocolo tanto para carbohidratos totales y oligosacáridos es el mismo. Con algunas adaptaciones del método señalado por Masuko *et al* (2005) el procedimiento es como sigue:

Mezclado: Se mezcla 50 μ L de extracto de muestra y 150 μ l de ácido sulfúrico y 30 μ L de fenol (5%) en un tubo ependorf de 250 μ L de capacidad.

Incubación: Se lleva a baño maría por 5 min. (Adaptación: Es importante que el tiempo de incubación sea tomado a hornilla apagada una vez llegado a ebullición). La reacción observada es cambio de color de transparente a marrón.

Lectura: Se extrae 150 μ L del incubado y se deposita en la placa micropozos. Se realiza la lectura de 490 nm restando blanco (agua destilada, ácido y fenol). Entre la salida de la incubación y lectura no debía pasar 15 minutos

Cálculos: El procedimiento de cálculo para determinación de carbohidratos totales y oligosacáridos de las muestras en g /100 g muestra (bs).es:

- *Carbohidratos y/o Oligosacáridos de acuerdo a la curva:* Reemplazar la absorbancia obtenida en las ecuaciones de curvas patrón de glucosa y manosa:galactosa. Obtener la concentración de cada una. Donde “y” es Abs y “x” es la concentración (mg/mL).
- *Carbohidratos y/o Oligosacáridos en base al extracto:* Multiplicar resultado de concentración por el volumen del extracto de muestra y los factores de dilución. El resultado sigue en mg/mL.
- *Carbohidratos y/o Oligosacáridos en base a la muestra:* Reemplazar la cantidad de muestra (g) que hay en 1 mL de extracto, realizar las conversiones y el resultado se expresa en g/100 g muestra (bh). Para el resultado final transformar a base seca y agregar la extracto etéreo que fue extraída.

5. REFERENCIAS

- BeMiller J. 2009. Carbohydrate analysis. Chapter 10. Nielsen S. Food Analysis, Food Science Texts Series. Springer Science, 2010. Disponible en dirección electrónica:

- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee Y. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Rev. Analytical Biochemistry*. 69-72.
- Neiva R, Zanette F. 2005. Variations of carbohydrate content in two year old buds and stems of apple tree region of low chill occurrence. *Rev. Bras. Frut.* 27(3). 352-355.
- Nielsen S. 2010. Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. *Food Analysis Laboratory Manual. Food Science Texts Series. Springer Science*, 2010. Disponible en direccion electronica:
- Saha S, Brewer C. 1994. Determination of the concentration of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydrate Research*. 157-167.

FORMA DE CÁLCULO DE CARBOHIDRATOS Y OLIGOSACÁRIDOS POR METODO FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO EN LECTOR DE MICROPOZOS

(Metodología adaptada de Saha y Brewer, 1994; BeMiller, 2010;

Masuko et al., 2005 y Pinto s/a)

Para una mejor comprensión de manejo de los cálculos establecido por el método fue necesario mostrar un ejemplo para determinar carbohidratos y oligosacáridos de tarwi H6:

Datos disponibles y/o requeridos

Curva Patrón de Glucosa $Y = 0.0792x + 0.0434$

Curva Patrón de Manosa:Galactosa $Y = 0.1587x - 0.0053$

L. mutabilis H6 sin desmargar $Abs = 0.296$

a. Carbohidratos y Oligosacáridos de acuerdo a la ecuación patrón

Se reemplaza la absorbancia obtenida en las ecuaciones de curvas patrón de glucosa y manosa:galactosa y se obtiene la concentración de carbohidratos totales y oligosacáridos respectivamente (mg/mL)

Carbohidratos totales

$$0.296 = 0.0792(x) + 0.0434$$

$$x = 3.2 \text{ mg/mL}$$

Oligosacáridos

$$0.296 = 0.1587(x) - 0.0053$$

$$x = 1.9 \text{ mg/mL}$$

b. Carbohidratos y Oligosacáridos en base al extracto

Multiplicar resultado (mg/mL) por el volumen del extracto inicial y luego por el factor de dilución al que fue sometido (9 es el volumen de extracto de muestra tanto numerador como denominador, no hay dilucion). El resultado sigue en mg/mL

Carbohidratos totales

$$(3.2) (9/9) = 28.76 \text{ mg/9mL}$$

Oligosacáridos

$$(1.9) (9/9) = 17.1 \text{ mg/9mL}$$

c. Carbohidratos y Oligosacaridos en base a la muestra

Reemplazar la cantidad de muestra que hay en 9 mL de extracto. Para el presente trabajo es 100 mg o 0.1 g. Se realiza las conversiones respectivas y se expresa en base a 100 g de muestra (bh)

Carbohidratos totales

$$\text{Carbohidratos} = \frac{28.76 \text{ mg}}{9 \text{ mL}} = \frac{(28.76 \text{ mg})}{0.1 \text{ g}} \left(\frac{1000}{1000} \right) \left(\frac{1}{1000} \right)$$

$$\text{Carbohidratos} = 28.76 \text{ g/100 gm}$$

Oligosacáridos

$$\text{Oligosacáridos} = \frac{17.1 \text{ mg}}{9 \text{ mL}} = \frac{(17.1 \text{ mg})}{0.1 \text{ g}} \left(\frac{1000}{1000} \right) \left(\frac{1}{1000} \right)$$

$$\text{Oligosacáridos} = 17.1 \text{ g/100 gm}$$

Es decir la muestra de lupino H6 sin desamargar desextracto etéreo presenta un contenido de carbohidratos totales de 28.76 % (bh). Considerando su humedad (12%) y contenido de extracto etéreo (20.47%) el contenido de carbohidratos y oligosacáridos en base seca del lupino H6 es como sigue:

Incluyendo humedad

Carbohidratos totales

$$\begin{array}{r} 28.76 \% \text{ carb} \quad \text{————} \quad (100-12)\% \text{ ms} \\ x \quad \text{————} \quad 100 \% \text{ ms} \\ x = 32.7 \% \text{ de carbohidratos (bs)} \end{array}$$

Oligosacáridos

$$\begin{array}{r} 17.1 \% \text{ oligo} \quad \text{————} \quad (100-12)\% \text{ ms} \\ x \quad \text{————} \quad 100 \% \text{ ms} \\ x = 19.4 \% \text{ de oligosacáridos (bs)} \end{array}$$

Incluyendo extracto etéreo

Carbohidratos totales

$$\begin{array}{r} 32.7 \% \text{ carb} \quad \text{————} \quad (100-20.47)\% \text{ ms} \\ x \quad \text{————} \quad 100 \% \text{ ms} \\ x = 41.09 \% \text{ de carbohidratos (bs)} \end{array}$$

Oligosacáridos

$$\begin{array}{r} 19.4 \% \text{ oligo} \quad \text{————} \quad (100-20.47)\% \text{ ms} \\ x \quad \text{————} \quad 100 \% \text{ ms} \\ x = 24.45 \% \text{ de oligosacáridos (bs)} \end{array}$$

Incluyendo humedad y extracto etéreo la cantidad de carbohidratos totales y oligosacáridos del lupino H6 sin desamargar es de 41 y 24.45 % respectivamente.

PRUEBAS PRELIMINARES DE CARBOHIDRATOS Y OLIGOSACÁRIDOS DE LUPINO POR METODO FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO EN LECTOR DE MICROPOZOS

(Metodología adaptada de Masuko *et al.*, 2005 y Saha-Brewer, 1994)

a. Análisis de Metodología original

Se analizó la metodología planteada por Masuko et al (2005) para determinación de glucosa en lector de micropozos y Saha-Brewer (1994) para oligosacáridos en espectrofotómetro UV, con el objetivo de identificar los parámetros que requerían adaptación para una determinación en micropozos. Las características genéricas de ambos métodos es como sigue:

Reactivos: Acido sulfúrico concentrado; solución Fenol del 5%; D-Manosa; D-Galactosa; L-Glucosa.

Preparación de curva patrón: Masuko et al (2005) solo realizó un curva de 1 a 150 nmol de manosa, mezclando 50 uL de extracto, 150 uL de H₂SO₄ y 30 uL de fenol 5%, en la misma placa micropozo, incubación por 5 min a 90°C y lectura a 490 nm, sin mención de blanco, logrando Abs de 0 a 1. Saha y Brewer (1994) realizaron curvas de rango de 5 a 50 ug de (5 - 80 nmol/mL) oligosacáridos, preparando 0.5 mL de solución azucarada, 0.5 mL de fenol 5% y 2.5 mL de H₂SO₄, dejando en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente y una lectura en espectrofotómetro a 490 nm con blanco de agua destilada en reemplazo de azúcar, logrando Abs de 0 a 2.

Tratamiento de muestra: Masuko et al (2005) y Saha-Brewer (1994) no mencionan el tratamiento de preparación de muestra.

Resultados

- Rango de concentraciones de curva diferidos: Tanto Masuko *et al* (2005) y Saha-Brewer (1994) mencionan rangos pequeños (0 a 100 nmol/mL o 0 a 0.02 ug/mL), a comparación de Pinto (s/a) que utiliza un rango mucho mas elevado (0 a 10 mg/mL), se

debía probar que las curvas produzcan la Rxn deseada y cumplan la ley de Beer (Abs de 0.2 a 0.8; cruce en cero y $R^2 > 0.9$).

- Orden de mezcla no definido: Masuko et al (2005) utilizó un orden de mezcla de reactivos inverso de Saha y Brewer (1994). Los primeros utilizan el ácido antes del fenol y los segundos el fenol luego el ácido. Se requería probar si existe diferencia de Abs entre ambos procedimientos.
- Ausencia de tratamiento de muestra: Masuko *et al* (2005) y Saha-Brewer (1994) no muestran un procedimiento de preparación de muestra, sin embargo Neiva y Zanette (2005) sí pero para muestras de hojas y ramas de árboles. BeMiller (2010) por otro lado presenta un procedimiento genérico con ausencia de algunos parámetros. Falta tener un procedimiento de preparación de muestra completo, por tanto se debía probar si un procedimiento adaptado lograría los resultados esperados.

b. Prueba de preparación de extracto de muestra

Se evaluó un protocolo de preparación de muestra fusionado de dos autores (Neiva y Zanette, 2005; BeMiller, 2005). Mediante esta prueba se pudo modificar o eliminar algunas etapas y también si había reacción de color y valor de abs. El procedimiento fue como sigue:

- Mezclado: Se preparó 100 mg de harina desgrasada y 30 mL de etanol (80%) en erlenmeyer de 150 mL y agitación hasta disolver (Neiva y Zanette, 2005). Se tapó con parafilm.
- Medición de pH: Se midió el pH para ver si era necesario una neutralización con CaCO_2 monitoreando con el potenciómetro. Solo si el pH no es neutro. Esto para evitar la hidrólisis de componentes lábiles al medio ácido como la sucrosa (BeMiller, 2010).
- Extracción: Se llevó a baño maría por 30 minutos (Neiva y Zanette, 2005). Según la AOAC 922.02. 3.1.02 la temperatura aplicada fue de ebullición de etanol (75°C).
- Enfriado: Se enfrió la solución a temperatura ambiente (BeMiller, 2010).

- Filtrado: Se filtró con papel filtro watman N° 4. El residuo solido se diluyó otra vez en etanol y se extrajo una vez más (BeMiller, 2010). Los filtrados se juntaron y se llamaron extracto etanólico (EET). Se almacenó en tubos falcom de 50 mL de capacidad, tapados y en refrigeración.
- Purificación: BeMiller (2010) señala que después de la extracción es necesario una purificación con técnicas de intercambio ionico para eliminar componentes con carga como pigmentos, aminoácidos, algunos péptidos entre otros que pueden afectar a la lectura mas exacta del analisis. (Esta operación fue opcional).
- Evaporación: Finalmente se eliminó el etanol en rotavapor a 40°C hasta lograr la pérdida del 80% de volumen y que quede solo el extracto acuoso de 20%. Cuando se obtuvo menos del 20% las diferencias fueron completadas con agua destilada. Los extractos acuosos de muestra se guardaron en refrigeración hasta su uso.
- Lectura: Se mezcló 50 uL de extracto de muestra, 150 uL de acido sulfúrico concentrado y finalmente 30 uL de fenol al 5% en un tubo ependorf de 250 uL (Masuko realizó la mezcla en el mismo micropozo, mas no se aplicó asi debido a carencia de placa con tapa). Se incubó por 5 minutos a temperatura de 90°C los tubos. Luego se retiró y enfrió y se extrajo 150 uL del tubo al micropozo y realizó la lectura a 490 nm con un blanco de agua destilada, acido y fenol (Saha y Brewer, 1994). Entre la salida de la incubación y lectura no debía pasar 15 minutos (Masuko et al., 2005).

Resultados

- Se midió el pH de las mezclas lupino y etanol y los valores obtenidos en promedio fue neutro (pH = 7.0) por tanto ya no era necesario la adición de CaCO₂.
- Respecto a la extracción en baño maria se tuvo que aplicar el SISTEMA REFLUJO el cual tuvo las siguientes características: Un matraz de 125 mL, tapa de jebe y pipeta de 1mL. El etanol se evaporaba y salía por la pipeta. En su transcurso se enfría y retorna al matraz, evitando asi la perdida de etanol (Ver Figura 4.3)



Figura 4.3. Sistema reflujo y filtrado de muestras de lupino

La cantidad dispuesta en el baño maria tuvo que ser máximo 1 cm de altura porque mas cantidad ocasionaba que los matraces pierdan equilibrio ocasionando caidas de los mismos. Programando el equipo a 80°C con la temperatura del agua baño maria a 75°C el etanol empezó a ebullicir (se visualizó burbujas que suben por las pipetas). Se midió el sistema y presento una temperatura de 73°C (Temperatura acorde a lo reportado por la AOAC 922.02 de 75°C para ebullición del etanol).

- Para el filtrado se dispuso de una base con orificios para tubos falcom de 50 mL de cap. como muestra la Figura 4.3
- Para la segunda extracción se utilizo 20 mL de etanol en vez de 30 como lo recomienda Neiva y Zanette (2005). Paso por baño maria en reflujo por 30 minutos.
- Cada extracto etanólico final variaba de 42.5 a 45 mL, es decir hubo perdidas en las etapas anteriores ya que lo ideal seria tener 50 mL de extracto etanolico. El tiempo de permanencia promedio en el rotavapor fue de 8 minutos. No se pudo obtener un eliminación exacta del 80% de volumen por lo que siempre tuvo que agregarse un poco de agua destilada a cada extracto de muestra. En promedio final se obtuvo un volumen de extracto de muestra de 9 mL
- El baño maría por 5 minutos tuvo que realizarse con ayuda de un soporte que permitió movilizar las muestras sin dificultad. Se observó que la mezcla es transparente

inicialmente y luego del tratamiento térmico reaccionó cambiando a color marrón (Ver Fig 4.4).

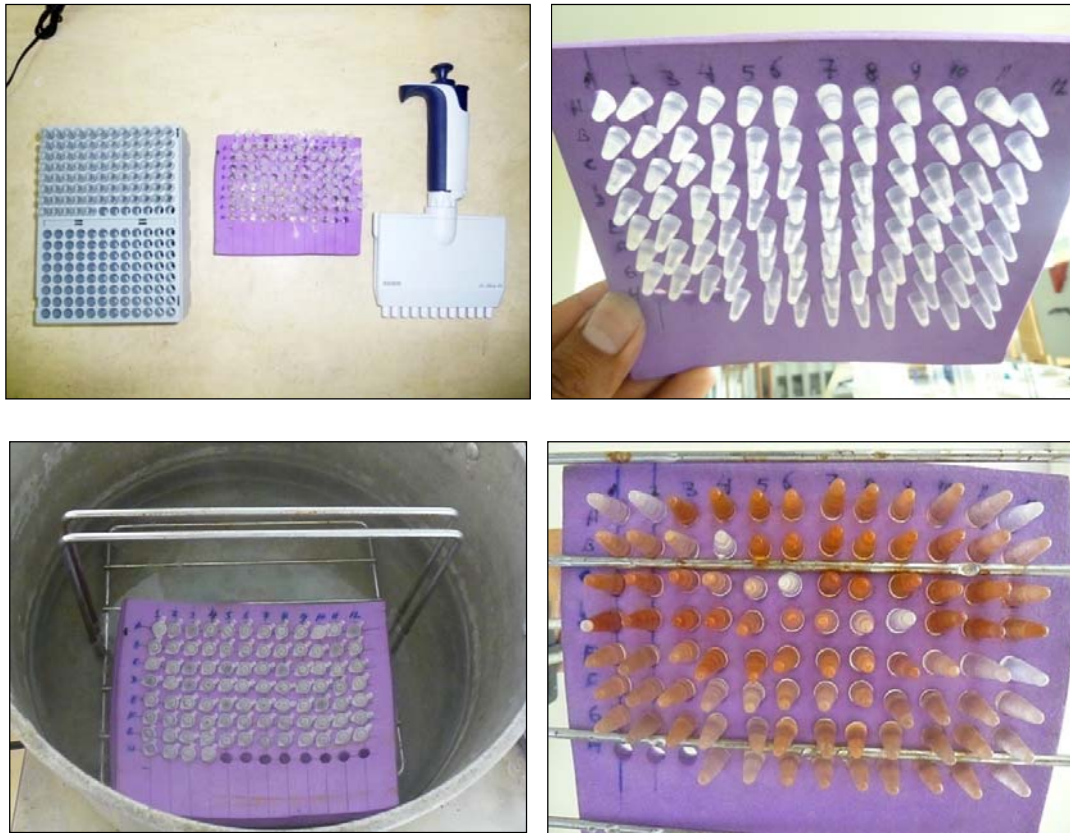


Figura 4.4. Mezcla y baño maría de las muestras

- Para la adición de muestra tratada a la placa y a los tubos de 250 μL fue muy importante el manejo de codificación en hoja externa en una tabla de A hasta la H filas y de 1 a 12 columnas (Ver Figura 4.5).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

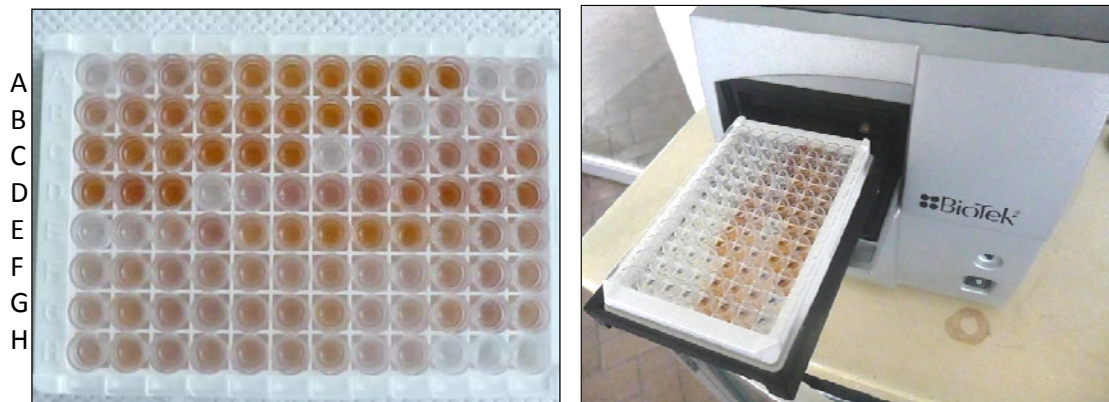


Figura 4.5. Placa micropozos de 96 celdas y lector de micropozos

b. Prueba de concentración de glucosa y orden de mezcla

- Se evaluó 2 concentraciones de glucosa según Masuko *et al* (2012) y Pinto (s/a) (0.02 y 10 mg/mL respectivamente) con el fin de encontrar la Rxn de color. Se realizó el proceso de lectura adaptando el método de Masuko et al (2005) (Todo similar a lo indicado anteriormente a excepción de la incubación en tubos ependorf de 250 uL y lectura con 150 uL en cada micropozo).
- Para evaluar si el orden de mezcla influyen en la lecturas de absorbancia se preparó en tubos ependorf de 1.5 mL de cap como sigue: 1) Extracto, H₂SO₄, Fenol (BeMiller, 2010; Masuko et al., 2005) y 2) Extracto, Fenol y H₂SO₄ (Saha y Brewer, 1994; AOAC 44.1.30). Se realizó el proceso de lectura como lo describe Masuko et al (2005).

Resultados:

Cuadro 4.3. Evaluación de orden de mezcla y concentración

Mezcla	Rxn coloración	Absorbancia (490 nm)*
Extracto (0.02 mg/mL)-Acido-Fenol	No	-
Extracto (0.02 mg/mL)-Fenol-Acido	No	-
Extracto (10 mg/mL)-Acido-Fenol	Si	0.707
Extracto (10 mg/mL)-Fenol-Acido	Si	0.758
Coefficiente de variabilidad		5 %

*promedio de n=2

Se observó que la concentración de glucosa de 0.02 mg/mL (100 nmol aprox) (Masuko et al 2005; BeMiller 2010; Saha y Brewer, 1994) no presentó Rxn, a diferencia de la concentración (10 mg/mL) planteado por Pinto (sd), el cual si produjo Rxn de coloración (dorado oscuro). La mayor cantidad de azúcar requerida puede ser debido a que la glucosa provista por el laboratorio de Fisicoquímica ya estaba degradada en estructura (posible oxidación u otro fenomeno) de tal manera que la producción de derivados de furanos fue mínima y el fenol no encontró furanos necesarios para condensar y colorear el sistema. Por tanto para la elaboración de una curva posterior la concentraciones debían ser mayores.

Respecto al orden de mezcla presentan un coeficiente de variabilidad de 5 % (0.707 y 0.758 de abs). Puede que al adicionar fenol y luego acido sea ligeramente mayor por alguna interferencia. En el presente trabajo de investigación se utilizó el primer orden.

c. Prueba de rango de concentraciones de curva y muestras

La prueba de curva y dilución de muestra se desarrolló como sigue:

- a. Se preparó dos curvas, Stock de glucosa (10 mg/mL) y Manosa-Galactosa (10 mg/mL): 5 puntos (2, 4, 6, 8, 10 mg/mL) cada curva.
- b. Dilución de muestra sin diluir, 1:2 y 1:3 para muestra de lupino inicial y desamargado. Para las diluciones se utilizó 500 µL de extracto y el resto agua destilada preparados en tubos ependorf de 1.5 mL de capacidad.

El protocolo de prueba fue el siguiente:

- Preparación de fenol 5% y estándares de azúcares: Debido a que el fenol y los azúcares son inestables se prepararon el mismo día de análisis. En fioles de 100 mL con agua destilada y se almacenaron cubiertos con papel aluminio en refrigeración hasta su uso.
- Preparación de puntos de curva: Los puntos de cada curva se prepararon para volúmenes de 1 mL y en tubos ependorf de 1.5 mL de cap. Cada punto se realizó en duplicado.
- Procedimiento de lectura: se mezcló 50 µL de extracto (standar o muestra) 150 µL de ácido sulfúrico concentrado y 30 µL de fenol 5% en un tubo ependorf de 250 µL (el envase fue una adaptación porque Masuko señala que se prepara en la misma placa micropozos). Se llevó a baño maría por 5 min (llegó a ebullición y se apagó la hornilla). Se extrajo 150 µL y se depositó en la placa micropozos y se realizó la lectura de 490 nm con blanco agua destilada, ácido y fenol.

Resultados

Cuadro 4.4. Pruebas de curvas patrón

Curvas (mg/mL)	Rango de Abs 490 nm	Ecuación Regresión	R ²	Desviación Standar
Gluc (2-10)	0.22 - 0.86	Y= 0.072x + 0.131	0.992	0.02514
Man:Gal (2 - 10)	0.35 - 1.35	Y= 0.125x + 0.130	0.993	0.03798

n = 2

Cuadro 4.5. Diluciones de muestra*

Dilución (E H6:WD)	H6 sin desamargar			H6 desamargado		
	Abs	Glu	Oligo	Abs	Glu	Oligo
Sin diluir	0,443	55,73	32,20	0,235	19,06	11,09
D (1:2)	0,120	-3,93	-2,06	0,100	-11,36	-6,33
D (1:3)	0,000	-70,19	-40,12	0,000	-72,03	-41,17

n = 2; WD = agua destilada; E H6 = extracto acuoso de lupino H6

De las curvas se observó que la glucosa en el rango de 2 a 10 mg/mL muestra un rango de Absorbancias similar al resultado anterior cerca de 1 y con un $R^2 > 0.99$; el rango fue optimo para trabajar como curva patrón, para los próximos análisis el rango de curva de glucosa sería de 1 a 10 mg/mL. Respecto a la curva de Man:Gal con las concentraciones de 2 a 10 mg/mL se obtuvo un rango de absorbancias mayor de 1, lo que nos llevó a suponer que hubo mas reacción en esta mezcla de azúcares y es muy posible por la mayor cantidad de furanos condensados por el fenol. Si la concentración estándar de dicha mezcla fue similar a la de la Glucosa entonces cabe suponer que la diferencia pudo ser debido a nivel estructural. Por tanto en la proxima curva Man:Gal el rango preparado sería la mitad (1 a 5 mg/mL).

Referido a la dilución de la muestra, se observó que solo las muestras sin diluir están dentro del rango de la curva, dando resultados de carbohidratos y oligosacáridos positivos para las demás diluciones se obtuvo valores negativos.

ANEXO 05. PROCEDIMIENTOS DE ALCALOIDES TOTALES POR PÚRPURA BROMOCRESOL (BKP)

El presente adjunto está dividido en 3 segmentos: metodología, forma de cálculo y pruebas preliminares del análisis.

METODOLOGÍA PARA ALCALOIDES TOTALES POR MÉTODO PÚRPURA BROMOCRESOL (BKP)

(Adaptación de Von Baer, 1978)

1. FUNDAMENTO

Según Castillo (1979) y Sosa (2000) el método de alcaloides totales por púrpura bromocresol (BKP) se fundamenta en extracción de alcaloides con solvente orgánico en medio alcalino. Los alcaloides son separados (fraccionados) de componentes salinos de la muestra por la adición de solución de alcalina (KOH, 15%) y Al_2O_3 en polvo; luego, dichos alcaloides liberados son recuperados con un solvente orgánico (cloroformo) a temperatura ambiente. Dicha solución orgánica conteniendo los alcaloides entra en contacto con el colorante ácido BKP haciéndolo inestable y degradándolo (degradación por hidroxilación). La variación de color es cuantificado por espectrofotometría a 410 nm. A menor absorbancia mayor contenido de alcaloides. El colorante disminuye su color de naranja oscuro a amarillo pálido (variación de pH de 5.2 a 6.8) y ésta es una referencia de contenido de alcaloides. El método descrito a continuación es una adaptación de la metodología original de Von Baer (1978). Las variaciones observadas fueron determinadas por experimentación preliminar (ver pruebas preliminares).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima: Muestra de lupino en harina

2.2 Reactivos y Equipos: Cloroformo (líquido concentrado), óxido de Aluminio Básico (polvo), Hidróxido de potasio (polvo), Purpura de Bromocresol BKP (polvo); Isopropanol (líquido concentrado); Agitador orbital; Espectrofotómetro UV con cubetas de cuarzo de 4 mL de capacidad.

2.3 Métodos

2.3.1 Preparación de reactivos

Solución de Hidróxido de Potasio 15% (w/v): Se prepara 1.5 g de KOH en una fiola de 10 mL con agua destilada. Almacenable a temperatura ambiente.

Solución Púrpura bromocresol BKP 4 mg/mL (w/v): Se prepara 40 mg de BKP en una fiola de 10 mL con isopropanol. Se cubre con papel aluminio. Preparación al día.

2.3.2 Determinación de alcaloides totales

El método fue adaptado del procedimiento planteado por Von Baer (1978) citado por Sosa (2000), Castillo (1979) y Muzquiz *et al* (1994) y es como sigue:

Mezclado: Se mezcla 50 mg de harina de lupino en polvo con 50 μ L de KOH (15%) y 150 mg de AlO₂ en un tubo falcom (50 mL cap). Se mezcla con una varilla o espátula hasta obtener una pequeña masa pegajosa. Evitar pérdidas en lo posible.

Agitación: Se agrega 5 mL de cloroformo. Se agita manualmente con varilla hasta lograr dispersión. Se tapa y luego se agita por 30 minutos a temperatura ambiente en el agitador orbital.

Filtrado: Se filtra con papel watman. El sobrenadante se coloca en tubos falcom (50 mL cap). El residuo se filtra 2 veces más con 2.5 mL de cloroformo. Se enraza el tubo falcom con cloroformo hasta 12.5 mL de volumen previamente graduado. Este volumen es el extracto de muestra.

Reacción: Se prepara 0.5 mL del extracto, 4.5 mL de cloroformo y 50 μ L de BKP en un tubo de vidrio (10 mL cap). Se tapa con parafilm, se agita suavemente y se deja en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente. Se observa una pigmentación amarilla pálida de toda la solución. Esta operación se realiza por duplicado o triplicado. Nota: el cloroformo se mide con probeta, el resto con micropipetas.

Lectura: Se realiza la lectura en espectrofotómetro UV a 410 nm, contra un blanco (5 mL de cloroformo y 50 uL de BKP). Los cálculos se realizan bajo la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Alcaloides} = \left(\frac{DO \times F \times PM \times V_T}{P \times V_p} \right) \times 0.1$$

Donde:

A, Absorbancia de la muestra analizada a 410 nm; F, factor de calibración (para lupanina 0,422); PM, peso molecular del alcaloide (para la lupanina es 248 mg); V_T, volumen total del extracto (mL); P, peso de la muestra (mg); V_p, volumen alícuota del extracto que se utiliza para la reacción con la solución púrpura bromocresolBKP (mL).

3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Castillo R. 1979. Extracción y Caracterización de extracto etéreo de tarwi. Tesis para optar el título de ingeniero de industrias alimentarias. UNALM. Lima-Perú.
- Muzquiz M, Cuadrado C Ayet G, de la Cuadra C, Burbano C, Osagie A. 1994. Variation of alkaloid components of Lupin Seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. J. Agric. Food Chem. 42. 1447-1450.
- Sosa C. 2000. Influencia de dos métodos de extracción de un aislado proteico de lupino (*L. mutabilis*) en sus propiedades funcionales. Tesis de magister. UNALM. Lima-Perú.
- Von Baer D. 1978. Procedimiento rápido para la determinación de los alcaloides totales en *L. mutabilis* con purpura bromocresol (BKP). Proyecto lupino. Informe N°3. Lima, Perú. Pp. 102-108.

FORMA DE CÁLCULO DE ALCALOIDES TOTALES
MÉTODO PÚRPURA BROMOCRESOL (BKP)

(Adaptación de Von Baer, 1978)

Para una mejor comprensión de manejo de los datos con la ecuación establecida por el método, fue necesario mostrar un ejemplo de cómo se utilizó los datos disponibles para la determinación de alcaloides totales. En el presente ejemplo se mostro la determinación de alcaloides totales del *L. albus* sin desamargar:

Datos disponibles y/o requeridos

Absorbancia de *L. albus* sin desamargar a 410 nm : 0.149

Factor de calibración : 0.422 (para la lupanina a 410 nm, Von Baer, 1978)

Peso molecular de la lupanina, PM (mg) : 248

Volumen del extracto, V_T (mL) : 12.5

Peso de la muestra, P (mg) : 50

Volumen de la alicuota, V_p (mL) : 0.5

a. Alcaloides Totales en base a la ecuación

Reemplazar los datos disponibles y/o requeridos en la ecuación proporcionada por Von Baer (1978). Se obtiene los alcaloides totales en porcentaje (bh).

$$\% \text{ Alcaloides} = \frac{DO \cdot F \cdot PM \cdot V_T}{P \cdot V_p} \cdot 0,1$$

$$\% \text{ Alcaloides} = \frac{(0.149)(0.422)(248 \text{ mg})(12.5 \text{ mL})}{(50 \text{ mg})(0.5 \text{ mL})} \cdot 0,1$$

$$\% \text{ Alcaloides} = 0.779 \% \text{ bh}$$

Incluyendo humedad

Si 0.779 % alcaloides totales ——— (100-12)% ms

x ——— 100 % ms

x = 0.886 % de alcaloides totales (bs)

El *L. albus* sin desamargar presenta 0.886 % de alcaloides totales.

**PRUEBAS PRELIMINARES DE ALCALOIDES TOTALES DE LUPINO
POR EL MÉTODO PÚRPURA BROMOCRESOL (BKP)**

(Adaptación de Von Baer, 1978)

a. Análisis de Metodología original

Se analizó la metodología planteada por Von Baer (1978) citado por Sosa (2000) y Castillo (1979) para determinación alcaloides totales en espectrofotómetro UV, con el objetivo de validar y/o adaptar parámetros de procedimientos. Las características genéricas es como sigue:

Reactivos: Solucion Hidróxido de potasio 15%, Oxido de Aluminio básico, Cloroformo, Solucion de purpura bromocresol (BKP), Espectrofotómetro UV.

Procedimiento de determinación: Segun Von Baer (1978) citado por Sosa (2000) y Castillo (1979) y es como sigue:

- Se mezcla 100 mg de harina de lupino finamente pulverizado se ponen en un mortero, se mezclan con 0.1 mL de solución de potasio al 15%
- Se añade aproximadamente 300 mg de oxido de aluminio básico cuidadosamente triturado hasta obtener una masa seca homogénea. Se traslada un matraz añadiendo 10 mL de cloroformo, se tapa y se agita por 30 min. Castillo (1979) realiza el traslado a una probeta.
- Se filtra la solución de cloroformo a una fiola de 25 mL, extraer el residuo dos veces mas con 5 mL de cloroformo, filtrar los extractos en el matraz y llenar hasta 25 mL con cloroformo. Castillo (1979) deposita los extractos en un matraz y llena a un volumen de 20 mL.
- Se toma 1mL de esta solución (para lupino amargo) en un tubo y añadir 9 mL de cloroformo
- Añadir 0.1 mL de BKP, agitar y dejar reposar 10 minutos y medir en cubetas de 1 cm a 410 nm contra el blanco de 10 mL de cloroformo y 0.1 mL de solucion BKP (Las cubetas deben permanecer tapdas para evitar la evaporacion del solvente).
- El contenido de alcaloides totales se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Alcaloides} = \frac{A \times F \times PM_{ALCALOIDE} \times V_T}{P \times V_P} \times 0,1$$

Donde: A, Absorbancia a 410 nm; F, factor de calibración (para lupanina 0,422); VT, volumen total del extracto (mL); VP, volumen, alícuota que se extrae al tubo de 10 mL para la determinación fotométrica, PM, peso molecular (para la lupanina es 248 mg) y P, peso de la muestra (mg)

Von Baer (1978) citado por Castillo (1979) señala que para cada alcaloide existe un tipo de factor de calibración:

Cuadro 5.1. Factor de calibración para alcaloides totales

Alcaloide	Factor de calibración	
	410 nm	450 nm
Lupanina	0.422	0.851
Hidroxilupanina	0.431	0.862
Esparteina	0.216	0.431

Resultados

- Ausencia de referencia de concentración del BKP
- Cantidad limitada de cloroformo, que imposibilita trabajar con rangos originales.
- Limitación de materiales y equipos para el mezclado, agitado y depósito del filtrado: pocos matraces para la cantidad de muestras a evaluar (mínimo 20 unidades) y espacio insuficiente para dejar en agitador orbital en simultáneo. Pocas fioles para depósito del filtrado. Se podría reemplazar los matraces y fioles por tubos Falcom de 50 mL de capacidad.

b. Determinación de concentración de BKP y reemplazo de envase

Debido a la limitación de materiales y cloroformo, la prueba se desarrolló para tubos Falcom, minimizando todos los parámetros a la mitad. La presente prueba busca conocer que concentración de BKP lograba una absorbancia que de un contenido de alcaloides de una muestra determinada de acuerdo a bibliografía. La prueba se desarrolló de la siguiente manera.

Preparación de soluciones BKP: Se preparó 4 concentraciones de solución BKP (4, 0.4 y 0.04 y 0.004 mg/mL) con isopropanol. Se peso 40 mg de BKP polvo en 10 mL de isopropanol. El resto de concentraciones de hallo diluyendo la solución estándar, extrayendo 1 mL y agregando 9 mL de isopropanol en tubos de vidrio. Todos los recipientes fueron cubiertos con papel aluminio y tapados con parafilm y almacenado en refrigeración.

Preparación de extracto de muestra: Se preparó muestras de L. albus sin desamargar modificando los parámetros a la mitad del método original para trabajar en tubos falcom. Se preparó dos muestras para cada concentración de solución BKP. El procedimiento fué como sigue:

- Se mezcló 50 mg de harina de lupino en polvo con 50 uL de KOH (15%) y 150 mg de AlO₂ en un mortero. Se mezcló con una varilla o espátula hasta obtener una pequeña masa pegajosa.
- Se trasladó a un tubo falcom y se agregó 5 mL de cloroformo. Se agitó manualmente con varilla hasta lograr dispersión. Se tapó y luego se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente en el agitador orbital.
- Se filtró con papel watman. El sobrenadante se colocó en tubos falcom (se reemplazó la fiola de 25 ya que se trabajó con la mitad 12.5 mL, además la graduación de los falcom es casi exacta con el de las fiolas). El residuo se filtró 2 veces mas con 2.5 mL de cloroformo. Se enrazó el tubo falcom con cloroformo hasta 12.5 mL. Este volumen fué el extracto de muestra.

Lectura: En un tubo de vidrio se mezcló 0.5 mL de extracto de muestra, 4.5 mL de cloroformo y 50 uL de solución BKP en las diferentes concentraciones. Se realizó la lectura restando un blanco (4.5 mL de cloroformo mas 50 uL de solución BKP) a 410 nm.

Resultados

Referido al procedimiento se descarto la mezcla en mortero debido a que presento mucho pérdida al momento de traslado al tubo falcom. Por tanto al repetir las mezclas se hicieron en el mismo tubo falcom, eliminando a los morteros.

Los resultados de absorbancia

Cuadro 5.2. Absorbancias de *L. albus* sin desamargar

(mg/mL)	Absorbancia (410 nm)	Alcaloides totales (%)
0.004	0	-
0.04	0	-
0.4	0	-
4	0.158	0.93

Casi todas las concentraciones dieron absorbancia cero a diferencia de la concentración de 4 mg/mL que permitió una lectura de alcaloides para *L. albus* dentro de los reportes bibliográficos, además estuvo acorde a lo obtenido por titulación para el mismo *L. albus* que tuvo 0.9% entonces se consideró que la concentración de 4 mg/mL de BKP es la adecuada para trabajar los demás análisis; además, se concluyó que la reducción de parámetros a la mitad haciendo uso de tubos falcom es aplicable.

**ANEXO 06. METODOLOGÍA DE DESGRASADO
POR INMERSIÓN Y AGITACIÓN**
(Metodología de Zegarra, 2012)

El método convencional de desgrasado de un material es por Soxhlet, sin embargo en ocasiones se requiere desgrasar un gran número de muestras en el menor tiempo posible y obtener datos de extracto etéreo aproximados. Zegarra (2012) adaptó una metodología de desgrasado por inmersión y agitación que permite desgrasar una gran número de muestras en simultáneo en menor tiempo, claro está que el resultado cuantitativo obtenido no es del todo exacto como el obtenido por el Soxhlet.

El fundamento es similar al soxhlet ya que la grasa es extraída por lixiviación mediante hexano, el reflujo del soxhlet es reemplazado por la agitación, solo el tiempo es mayor debido a que este se realiza en refrigeración y no a temperatura ebullición. El procedimiento adaptado para el lupino es:

- Pesado: Se pesa papel filtro y 5 gr de harina de lupino. Se registra el peso papel para ser restado al peso final.
- Empacado: Se empaca en el papel filtro la harina de lupino y se amarra con pabilo (Ver Figura 2). De preferible pabilo delgado para que disminuya el nivel de obstrucción. También muy importante la codificación de cada muestra.
- Inmersión: La relación de inmersión es materia prima: hexano es de 1:10 (w/w). Ej. Para desextracto etéreo 10 muestras de 5 g c/u el total de hexano utilizado fue de 50 mL preparado en un beacker de 2 Lt de capacidad (Ver Figura 6.1).
- Agitación: Se deja en agitación por 24 horas con agitador magnético dentro de una cámara de refrigeración. Nota: para que la pastilla del agitador gire sin interrupción de las muestras, se adapta una tapa con agujeros de tal manera que la pastilla este dentro y gire libremente (Ver Figura 6.1). Es necesario cubrir el envase donde se colocan las muestras para que el hexano no se volatilice.

- Secado: Los empaques se abren cuidadosamente, se colocan en placas petrie. Se deja en estufa a 35°C por 2 horas (eliminación del hexano). Luego se pesa nuevamente cada empaque con muestra. Se resta el peso del papel. La diferencia entre muestra inicial y muestra final es la cantidad de extracto etéreo extraída, la cual debe ser expresada en porcentaje y trasladada a base seca para su inclusión en análisis con muestras desgrasadas.

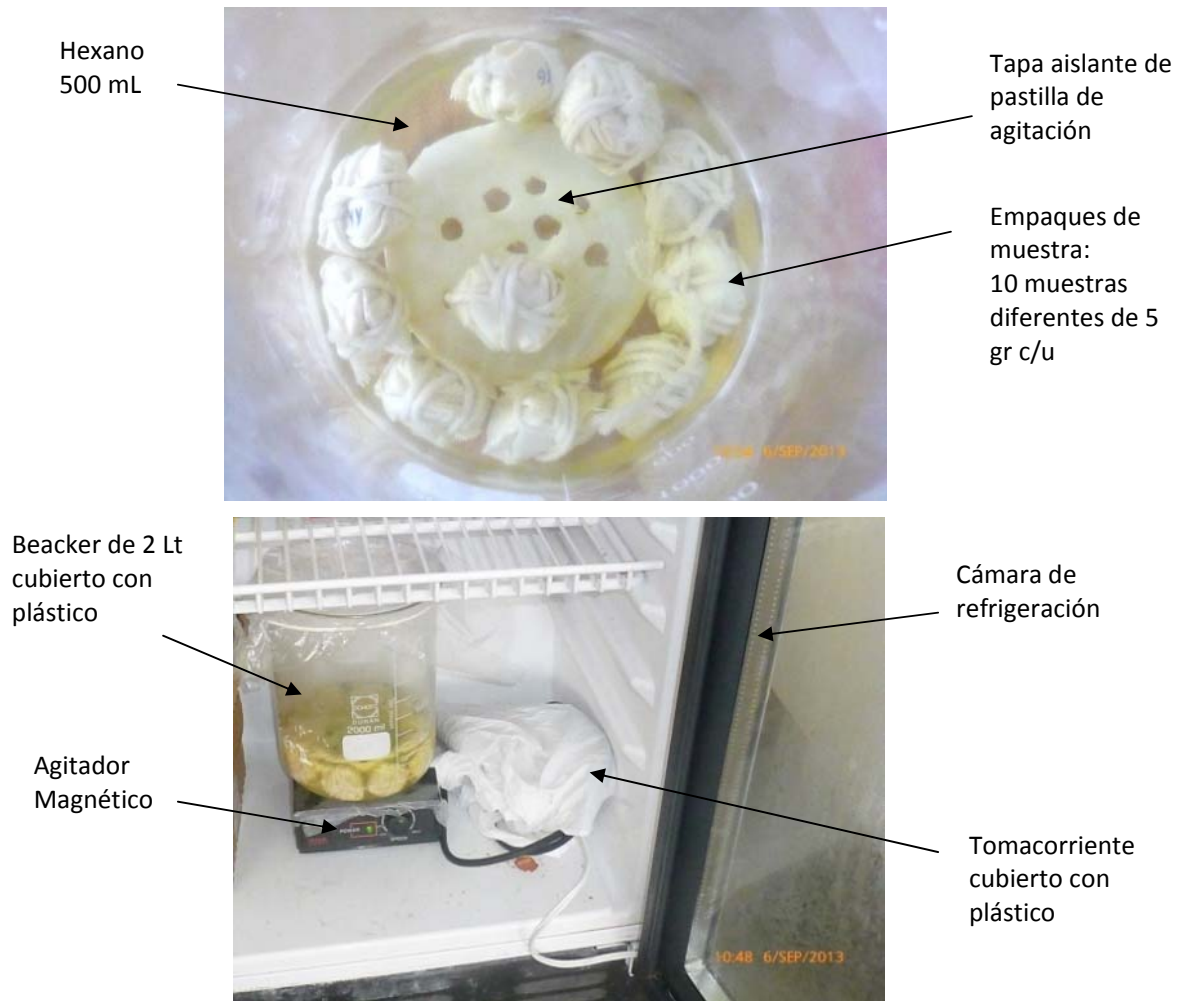


Figura 6.1. Desgrasado por inmersión-agitación

ANEXO 07. PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA DE LUPINO SIN DESAMARGAR Y LUPINO DESAMARGADO

Se determinó la materia seca mediante las siguientes relaciones:

$$MS_{Lc} = 100 - H_{Lc} \quad ; \quad MS_{Ld} = \frac{W_{Ld}}{W_{Lc}} (100 - H_{Ld})$$

Donde:

MS_{Lc} es el porcentaje de materia seca de lupino sin desamargar; 100 es el porcentaje total de la muestra de lupino sin desamargar; H_{Lc} es el porcentaje de Humedad de la muestra de lupino sin desamargar.

MS_{Ld} es el porcentaje de materia seca de lupino desamargado; W_{Ld} es peso de lupino desamargado humedo (kg); W_{Lc} es peso de lupino crudo seco (kg); H_{Ld} es el porcentaje de Humedad de la muestra de lupino desamargado.

A continuacion se muestra un ejemplo de cálculo de materia seca del tarwi H6 sin desamargar y desamargado

Tarwi sin desamargar H6

- Peso = 1.4 kg
- Humedad = 8.91%
- Materia seca = $100 - 8.91 = 91.1 \%$

Tarwi desamargado H6

- Peso = 2.89 kg
- Humedad = 71.74%
- Materia seca = $\frac{2.89}{1.4} (100 - 71.74) = 58.33\%$

ANEXO 08. PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO DE LUPINO SECO DESAMARGADO

Se determinó el rendimiento mediante la siguiente relación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{MS_2}{MS_1} \right) \times 100$$

Donde: MS_2 = Porcentaje de materia seca de lupino desamargado
 MS_1 = Porcentaje de materia seca de lupino crudo

A continuación se muestra un ejemplo de cálculo para el rendimiento de L. H6

Tarwi sin desamargar H6

- Peso = 1.4 kg
- Humedad = 8.91%
- Materia seca = 100- 8.91 = 91.1 %

Tarwi desamargado H6

- Peso = 2.89 kg
- Humedad = 71.74%
- Materia seca = $\frac{2.89}{1.4} (100 - 71.74) = 58.33\%$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{58.33}{91.1} \right) \times 100$$

Rendimiento = 64.02 %

ANEXO 09. VARIACIÓN DE PESO HUMEDO DEL LUPINO DURANTE EL PROCESO DE DESAMARGADO

LUPINO	ORIGEN	Lupino sin desamargar			Lupino Desamargado		Materia seca		Materia seca respecto peso lupino inicial		Rendimiento %
		Peso (kg)	Humedad (%)	Humedad (kg)	Peso (kg)	Humedad (%)	Amargo (Kg)	Desamarg (kg)	Amargo (%)	Desamargado (%)	
<i>L. mutabilis</i> var. AAHO	LIB	1.4	8.16	0.11	3.34	71.20	1.29	0.96	91.84	68.68	74.78
<i>L. mutabilis</i> var. Altagracia	ANC	1.4	8.82	0.12	3.29	71.06	1.28	0.95	91.18	67.96	74.53
<i>L. mutabilis</i> var. Cholo Fuerte	ANC	1.4	8.77	0.12	3.31	69.74	1.28	1.00	91.24	71.53	78.41
<i>L. mutabilis</i> var. VICOS	ANC	1.4	8.28	0.12	3.56	72.28	1.28	0.99	91.73	70.43	76.78
<i>L. mutabilis</i> var. H6	JUN	1.4	8.91	0.12	2.89	71.74	1.28	0.82	91.10	58.32	64.02
<i>L. mutabilis</i> var. Moteado Beige	JUN	1.4	8.88	0.12	3.32	72.71	1.28	0.91	91.13	64.71	71.01
<i>L. mutabilis</i> var. Compuesto Blanco Semiprecoz	JUN	1.4	9.21	0.13	3.54	72.37	1.27	0.98	90.79	69.90	77.00
<i>L. mutabilis</i> var. Andenes	CUZ	1.4	8.70	0.12	3.54	74.28	1.28	0.91	91.31	65.07	71.27
<i>L. mutabilis</i> var. Yunguyo	PUN	1.4	8.74	0.12	3.75	73.66	1.28	0.99	91.27	70.47	77.22
<i>L. albus</i> UA-2013	LIM	1.4	10.39	0.15	3.02	69.25	1.25	0.93	89.61	66.27	73.95
Promedio (<i>L. mutabilis</i>)		1.400	8.716		3.392	72.113	1.28	0.94	91.284	67.453	73.9

ANEXO 10. RESUMEN DE ANALISIS PROXIMAL DE LUPINO

Cuadro 10.1 Contenido Proximal de 10 genotipos de Lupino amargo y desamargado (g/100 g muestra bh)*

Lupino	ORIGEN	Proteína cruda (%) bh		Carbohidratos (%) bh		Extracto etéreo (%) bh		Fibra cruda (%) bh		Cenizas (%) bh	
		Amargo	Desamargado	Amargo	Desamargado	Amargo	Desamargado	Amargo	Desamargado	Amargo	Desamargado
AAHO	LIB	43.08 ± 0.028	14.29 ± 0.021	29.37 ± 0.071	8.64 ± 0.035	15.58 ± 0.042	5.28 ± 0.057	7.60 ± 0.042	4.20 ± 0.028	3.81 ± 0.028	0.61 ± 0.035
Altagracia	ANC	37.29 ± 0.021	14.51 ± 0.035	33.80 ± 0.057	8.46 ± 0.042	16.51 ± 0.035	5.18 ± 0.042	10.01 ± 0.049	5.50 ± 0.057	3.60 ± 0.035	0.80 ± 0.028
Cholo Fuerte	ANC	38.59 ± 0.12	14.61 ± 0.035	32.21 ± 0.085	7.75 ± 0.127	16.75 ± 0.042	7.12 ± 0.021	7.33 ± 0.057	3.52 ± 0.021	3.69 ± 0.014	0.80 ± 0.035
VICOS	ANC	40.00 ± 0.106	12.81 ± 0.042	33.23 ± 0.127	9.33 ± 0.064	14.98 ± 0.042	4.60 ± 0.042	10.70 ± 0.049	3.60 ± 0.028	3.52 ± 0.028	0.99 ± 0.021
H6	JUN	37.58 ± 0.064	15.01 ± 0.049	32.52 ± 0.205	6.95 ± 0.042	17.02 ± 0.057	5.61 ± 0.021	10.70 ± 0.049	5.21 ± 0.035	3.99 ± 0.035	0.70 ± 0.014
Moteado Beige	JUN	39.99 ± 0.085	13.50 ± 0.014	29.43 ± 0.057	8.06 ± 0.064	18.22 ± 0.028	5.03 ± 0.028	7.82 ± 0.071	5.80 ± 0.057	3.49 ± 0.035	0.70 ± 0.042
Compuesto Blanco Semiprecoz	JUN	37.56 ± 0.085	14.01 ± 0.035	32.64 ± 0.113	9.12 ± 0.191	16.10 ± 0.042	3.70 ± 0.057	7.93 ± 0.064	3.99 ± 0.014	4.49 ± 0.028	0.81 ± 0.028
Andenes	CUZ	41.43 ± 0.057	11.00 ± 0.057	28.99 ± 0.049	8.73 ± 0.071	17.12 ± 0.049	5.29 ± 0.028	8.17 ± 0.042	5.20 ± 0.028	3.78 ± 0.078	0.70 ± 0.028
Yunguyo	PUN	37.80 ± 0.000	12.00 ± 0.035	27.91 ± 0	7.90 ± 0.127	21.61 ± 0.46	5.62 ± 0.042	9.00 ± 0.028	3.00 ± 0.042	3.60 ± 0.014	0.83 ± 0.014
L. albus UA-2013	LIM	27.34 ± 0.057	11.01 ± 0.035	46.70 ± 0.021	16.48 ± 0.021	12.01 ± 0.057	2.47 ± 0.035	12.10 ± 0.071	4.02 ± 0.028	3.58 ± 0.035	0.81 ± 0.021
Promedio L. mutabilis		39.26	13.52	31.12	8.33	17.10	5.27	8.80	4.45	3.77	0.77

* Media ± desviación estándar de dos repeticiones

**Origen: LIB= La Libertad; JUN= JUNIN (INIA); ANC=Ancash; CUZ=Cuzco (INIA); PUN=Puno; LIM=Lima PGLO-UNALM

Cuadro 10.2 Contenido Proximal de 10 genotipos de Lupino amargo y desamargado (g/100 g muestra bs)*

Genotipo	Origen	Proteína cruda (%)*		Carbohidratos por Diferencia (%)*		Fibra cruda(%)	
		1	2	1	2	1	2
AAHO	Libertad	46,91±0,28a	49,59±0,66c	31,98±0,69d	29,98±1,10c	8,28±0,4f	14,6±0,9e
ALT	Ancash	40,89±0,21f	50,11±1,09c	37,07±0,56b	29,23±1,32c	11±0,5c	19±1,8c
CHF	Ancash	42,29±1,18d	48,26±1,05d	35,3±0,84c	25,61±3,78d	8,03±0,6g	11,6±0,6g
VI	Ancash	43,6±1,04c	46,21±1,37e	36,23±1,25c	33,64±2,06b	11,7±0,5b	13±0,9f
H6	Junín	41,25±0,63e	53,1±1,57a	35,69±2,02c	24,59±1,35d	11,7±0,5b	18,4±1,1d
MB	Junín	43,88±0,84c	49,46±0,47c	32,3±0,56d	29,55±2,09c	8,58±0,7e	21,3±1,9a
CBS	Junín	41,37±0,84e	50,69±1,15b	35,95±1,12	32,99±6,21b	8,73±0,6e	14,4±0,5e
AND	Cuzco	45,38±0,56b	42,77±1,98f	31,75±0,49d	33,94±2,47b	8,95±0,4e	20,2±1b
YY	Puno	41,42±0e	45,53±1,21e	30,58±0e	29,99±4,34c	9,86±0,3d	11,4±1,5g
ALBUS	Lima	30,51±0,57g	35,79±1,03g	52,11±0,21a	53,58±0,62a	13,5±0,7a	13,1±0,8f

* Media ± IC al 95% (n=2)

1 = lupino sin desamargar y 2= lupino desamargado

Cuadro 10.3 Contenido Proximal de 10 genotipos de Lupino amargo y desamargado (g/100 g muestra bs)*

Genotipo	Origen	Grasa (%)		Cenizas (%)		Valor Energético (kcal)	
		1	2	1	2	1	2
AAHO	Libertad	17±0,4d	18,3±1,8e	4,2±0,3c	2,1±1,1b	468,23±7,61d	483,25±14,11c
ALT	Ancash	18,1±0,4c	17,9±1,3e	3,9±0,4c	2,8±0,9b	474,76±0,07c	478,42±12,72c
CHF	Ancash	18,4±0,4c	23,5±0,6a	4±0,1c	2,6±1,1b	475,62±2,37c	507,04±5,25a
VI	Ancash	16,3±0,4d	16,6±1,4f	3,8±0,3c	3,6±0,7a	466,31±2,91d	468,76±1,37d
H6	Junín	18,7±0,6c	19,8±0,7d	4,4±0,4b	2,5±0,5b	475,92±0,56c	489,26±6,97b
MB	Junín	20±0,3b	18,4±0,9e	3,8±0,4c	2,6±1,4b	484,67±3,62b	481,88±14,89c
CBS	Junín	17,7±0,4c	13,4±1,8g	5±0,3a	2,9±0,9b	468,88±2,66d	455,23±3,68e
AND	Cuzco	18,7±0,5c	20,6±1c	4,1±0,8c	2,7±1b	477,19±0,21c	491,95±8,89b
YY	Puno	23,7±4,5a	21,3±1,5b	3,9±0,1c	3,2±0,5b	501,05±40,7a	494,06±0,48b
ALBUS	Lima	13,4±0,6e	8,02±1h	4±0,4c	2,6±0,6b	451,10±3,68e	429,61±10,94f

* Media ± IC al 95% (n=2)

1 = lupino sin desamargar y 2= lupino desamargado

**ANEXO 11. ANALISIS DE VARIANZA DE COMPOSICIÓN PROXIMAL DE
DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO SIN DESMARGAR Y DESAMARGADO
ANOVA DE UN FACTOR**

Inter-grupos = Tratamientos = 10 genotipos y 2 repeticiones

**Cuadro 11.1 ANOVA de proteína cruda de diez genotipos de lupino
sin desamargar y desamargado**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Lupinos sin desamargar	Inter-grupos	351,232	9	39,026	6234,146	,000
	Intra-grupos	,063	10	,006		
	Total	351,294	19			
Lupinos desamargados	Inter-grupos	441,892	9	49,099	2616,529	,000
	Intra-grupos	,188	10	,019		
	Total	442,080	19			

**Cuadro 11.2 Prueba de Tukey de proteína cruda de diez genotipos de lupino
sin desamargar**

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Albus - Lima	2	30,51g						
Altagracia- Ancash	2		40,895f					
H6 - Junin	2			41,25e				
CBS - Junin	2			41,37e				
Yunguyo - Puno	2			41,42e				
Cholo Fuerte - Ancash	2				42,295d			
Vicos - Ancash	2					43,6c		
Moteado Beige - Junin	2					43,885c		
Andenes - Cuzco	2						45,375b	
AAHO - La Libertad	2							46,91a
Sig.		1,000	1,000	,536	1,000	,083	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

**Cuadro 11.3 Prueba de Tukey de proteína cruda de diez genotipos de
lupino desamargado**

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Albus - Lima	2	35,79h								
Andenes - Cuzco	2		42,765g							
Yunguyo - Puno	2			45,535f						
Vicos - Ancash	2				46,21e					
Cholo Fuerte - Ancash	2					48,255d				
Moteado Beige - Junin	2						49,46c			
AAHO - La Libertad	2						49,59c	49,59c		
Altagracia- Ancash	2							50,115c		
CBS - Junin	2								50,69b	
H6 - Junin	2									53,095a
Sig.		1	1	1	1	1	0,99	0,06	1	1

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro 11.4 ANOVA de carbohidratos por diferencia de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

ANOVA de un factor						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CarbohiDif1	Inter-grupos	677,142	9	75,238	6756,896	,000
	Intra-grupos	,111	10	,011		
	Total	677,254	19			
CarbohiDif2	Inter-grupos	1179,585	9	131,065	1159,150	,000
	Intra-grupos	1,131	10	,113		
	Total	1180,716	19			

Cuadro 11.5 Prueba de Tukey de carbohidratos de diez genotipos de lupino sin desamargar

HSD de Tukey									
Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Yunguyo - Puno	2	30,58e							
Andenes - Cuzco	2		31,745d						
AAHO - La Libertad	2		31,98d	31,98d					
Moteado Beige - Junin	2			32,295d					
Cholo Fuerte - Ancash	2				35,305c				
H6 - Junin	2				35,69c	35,69c			
CBS - Junin	2					35,95c	35,95c		
Vicos - Ancash	2						36,23c		
Altagracia- Ancash	2							37,07b	
Albus - Lima	2								52,11a
Sig.		1,000	,495	,197	,078	,381	,303	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro 11.6 Prueba de Tukey de carbohidratos de diez genotipos de lupino desamargado

HSD de Tukey					
Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
H6 - Junin	2	24,595d			
Cholo Fuerte - Ancash	2	25,605d			
Altagracia- Ancash	2		29,225c		
Moteado Beige - Junin	2		29,545c		
AAHO - La Libertad	2		29,975c		
Yunguyo - Puno	2		29,99c		
CBS - Junin	2			32,99b	
Vicos - Ancash	2			33,64b	
Andenes - Cuzco	2			33,945b	
Albus - Lima	2				53,58a
Sig.		,192	,471	,239	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro 11.7 ANOVA de extracto etéreo de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

ANOVA de un factor						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Extracto etéreo1	Inter-grupos	123,992	9	13,777	502,530	,000
	Intra-grupos	,274	10	,027		
	Total	124,266	19			
Extracto etéreo2	Inter-grupos	348,405	9	38,712	1936,554	,000
	Intra-grupos	,200	10	,020		
	Total	348,605	19			

Cuadro 11.8 Prueba de Tukey de extracto etéreo de diez genotipos de lupino sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Albus - Lima	2	13,405e					
Vicos - Ancash	2		16,33d				
AAHO - La Libertad	2		16,965d				
CBS - Junin	2			17,735c			
Altagracia- Ancash	2			18,1c	18,1c		
Cholo Fuerte - Ancash	2			18,36c	18,36c		
H6 - Junin	2				18,685c		
Andenes - Cuzco	2				18,745c		
Moteado Beige - Junin	2					19,995b	
Yunguyo - Puno	2						23,675a
Sig.		1,000	,060	,065	,055	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro 11.9 Prueba de Tukey de extracto etéreo de diez genotipos de lupino desamargados

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Albus - Lima	2	8,015h							
CBS - Junin	2		13,395g						
Vicos - Ancash	2			16,595f					
Altagracia- Ancash	2				17,895e				
AAHO - La Libertad	2				18,33e				
Moteado Beige - Junin	2				18,43e				
H6 - Junin	2					19,835d			
Andenes - Cuzco	2						20,57c		
Yunguyo - Puno	2							21,335b	
Cholo Fuerte - Ancash	2								23,51a
Sig.		1,000	1,000	1,000	,064	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro 11.10 ANOVA de fibra cruda de diez genotipos de lupino
sin desamargar y desamargado

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Fibra1	Inter-grupos	61,147	9	6,794	1897,802	,000
	Intra-grupos	,036	10	,004		
	Total	61,183	19			
Fibra2	Inter-grupos	243,945	9	27,105	1528,332	,000
	Intra-grupos	,177	10	,018		
	Total	244,122	19			

Cuadro 11.11 Prueba de Tukey de fibra cruda de diez genotipos de lupino
sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Cholo Fuerte - Ancash	2	8,035g							
AAHO - La Libertad	2		8,275f						
Moteado Beige - Junin	2			8,585e					
CBS - Junin	2			8,73e	8,73e				
Andenes - Cuzco	2				8,95e				
Yunguyo - Puno	2					9,86d			
Altagracia- Ancash	2						10,97c		
Vicos - Ancash	2							11,66b	
H6 - Junin	2							11,74b	
Albus - Lima	2								13,505a
Sig.		1,000	1,000	,400	,075	1,000	1,000	,922	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro 11.12 Prueba de Tukey de fibra cruda de diez genotipos de lupino
desamargados

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Yunguyo - Puno	2	11,385g						
Cholo Fuerte - Ancash	2	11,61g						
Vicos - Ancash	2		12,985f					
Albus - Lima	2		13,075f					
CBS - Junin	2			14,44e				
AAHO - La Libertad	2			14,58e				
H6 - Junin	2				18,42d			
Altagracia- Ancash	2					19c		
Andenes - Cuzco	2						20,22b	
Moteado Beige - Junin	2							21,25a
Sig.		,781	,999	,980	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro 11.13 ANOVA de ceniza de diez genotipos de lupino
sin desamargar y desamargado

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Cenizas1	Inter-grupos	1,992	9	,221	134,120	,000
	Intra-grupos	,017	10	,002		
	Total	2,008	19			
Ceniza2	Inter-grupos	2,816	9	,313	30,104	,000
	Intra-grupos	,104	10	,010		
	Total	2,920	19			

Cuadro 11.14 Prueba de Tukey de ceniza de diez genotipos de lupino
sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Moteado Beige - Junin	2	3,825c					
Vicos - Ancash	2	3,84c	3,84c				
Altagracia- Ancash	2	3,945c	3,945c	3,945c			
Yunguyo - Puno	2	3,945c	3,945c	3,945c			
Albus - Lima	2		3,99c	3,99c	3,99c		
Cholo Fuerte - Ancash	2			4,045c	4,045c		
Andenes - Cuzco	2				4,13c		
AAHO - La Libertad	2				4,15c		
H6 - Junin	2					4,375b	
CBS - Junin	2						4,945a
Sig.		,205	,073	,382	,051	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro 11.15 Prueba de Tukey de ceniza de diez genotipos de lupino
desamargado

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
AAHO - La Libertad	2	2,1b				
H6 - Junin	2	2,475b	2,475b			
Moteado Beige - Junin	2		2,56b	2,56b		
Albus - Lima	2		2,62b	2,62b		
Cholo Fuerte - Ancash	2		2,625b	2,625b		
Andenes - Cuzco	2		2,72b	2,72b		
Altagracia- Ancash	2		2,76b	2,76b	2,76b	
CBS - Junin	2			2,93b	2,93b	
Yunguyo - Puno	2				3,15b	
Vicos - Ancash	2					3,555a
Sig.		,075	,253	,080	,061	1,000

Cuadro 11.16 ANOVA de valor energético de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Energia1	Inter-grupos	3009,207	9	334,356	152,948	,000
	Intra-grupos	21,861	10	2,186		
	Total	3031,068	19			
Energia2	Inter-grupos	8821,191	9	980,132	903,369	,000
	Intra-grupos	10,850	10	1,085		
	Total	8832,040	19			

Cuadro 11.17 Prueba de Tukey de valor energético de diez genotipos de lupino sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Albus - Lima	2	451,1e				
Vicos - Ancash	2		466,31d			
AAHO - La Libertad	2		468,23d			
CBS - Junin	2		468,88d			
Altagracia- Ancash	2			474,755c		
Cholo Fuerte - Ancash	2			475,615c		
H6 - Junin	2			475,92c		
Andenes - Cuzco	2			477,185c		
Moteado Beige - Junin	2				484,675b	
Yunguyo - Puno	2					501,055a

Cuadro 11.18 Prueba de Tukey de valor energético de diez genotipos de lupino desamargados

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Albus - Lima	2	429,61f							
CBS - Junin	2		455,23e						
Vicos - Ancash	2			468,76d					
Altagracia- Ancash	2				478,425c				
Moteado Beige - Junin	2				481,885c	481,885c			
AAHO - La Libertad	2					483,25c			
H6 - Junin	2						489,26b		
Andenes - Cuzco	2						491,95b	491,95b	
Yunguyo - Puno	2							494,06b	
Cholo Fuerte - Ancash	2								507,035a
Sig.		1,000	1,000	1,000	,124	,930	,331	,602	1,000

ANEXO 12. RESUMEN DE COMPONENTES DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO SIN DESAMARGAR Y DESAMARGADO DETERMINADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

Cuadro 12.1 Contenido fisicoquímico de diez genotipos de lupino en base seca

Genotipo	Origen	Proteína soluble (%) ^a		Carbohidratos por Espectrofotometría (%) ^b		Actividad Antioxidante (μmol ET/100 gm) ^c		Oligosacáridos (%) ^d		Alcaloides totales (%) ^e	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
		AAHO	Libertad	34,75±2,29d	20,03±5,49d	30,3±0,31b	22,33±0,96a	375,3±27,46c	338,6±31,2c	19,1±0,16b	12,67±0,52a
ALT	Ancash	31,59±4,13e	19,65±2,33d	25,42±1,98c	23,66±3,47a	678,5±140,8b	342,1±16,1c	16,5±0,99c	13,4±1,90a	2,76±0,4a	0,07±0,2a
CHF	Ancash	38,9±4,34c	23,15±4,78c	24,7±3,53c	15,25±0,79c	536,7±174,3b	347,2±48,6c	16,2±1,76c	8,79±0,43c	2,41±2a	0,1±0,9a
VI	Ancash	41,11±5,3b	27,81±2,91b	41,03±4,26a	20,4±1,52b	622,3±108,7b	373,6±37,4b	24,2±2,12a	11,59±0,83b	2,79±0,8a	0,09±0,3a
H6	Junín	40,91±3,4b	18,84±5,42d	41,09±5,56a	19,58±0,96b	775,4±260,4a	402,9±27,8a	24,5±2,78a	11,17±0,53b	2,73±1,2a	0,08±0,5a
MB	Junín	37,87±3,1c	18,38±2,45d	22,04±1,43c	17,37±0,69c	759,9±181,5a	363,9±29,4b	14,8±0,71c	9,95±0,38c	2,81±1,8a	0,13±0,6a
CBS	Junín	34,48±3,76d	18,19±4,16d	25,52±6,36c	16,82±2,1c	572,4±93,94b	384,9±36,6b	16,5±1,0c	9,65±1,15c	2,96±0,2a	0,15±0,1a
AND	Cuzco	43,65±3,35a	20,32±2,54d	38,71±4,87a	16,95±0,26c	488,2±42,62b	337,8±25,7c	23,2±2,43a	9,72±0,14c	2,39±1,4a	0,05±0,4a
YY	Puno	34,34±3,02d	33,3±2,94a	22,49±3,19c	17,24±1,22c	609,8±110,1b	344,6±45,2c	15,2±1,59c	9,88±0,67c	2,98±1,6a	0,11±0,6a
ALBUS	Lima	26,67±4,52f	20,49±1,24d	35,87±4,91a	16,11±0,53c	591,2±104,6b	336,4±28,1c	21,6±2,45a	9,27±0,29c	0,88±0,9b	0,04±0,4a

Media ± IC al 95% (^a n=2; ^b n= 3; ^c n=2; ^d n=3; ^e n=2)

1 = Lupino sin desamargar

2 = Lupino desamargado

**ANEXO 13. ANALISIS DE VARIANZA DE COMPONENTES
DE DIEZ GENOTIPO DE LUPINO POR ESPECTROFOTOMETRÍA**

ANOVA DE UN FACTOR

Inter-grupos = Tratamientos = 10 genotipos y 2 repeticiones

Cuadro 13.1 ANOVA de proteína soluble de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Lupino 1	Inter-grupos	464,016	9	51,557	288,158	,000
	Intra-grupos	1,789	10	,179		
	Total	465,805	19			
Lupino 2	Inter-grupos	429,473	9	47,719	283,958	,000
	Intra-grupos	1,681	10	,168		
	Total	431,153	19			

Cuadro 13.2 Prueba de Tukey de proteína soluble de diez genotipos de lupino sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Albus - Lima	2	26,665f					
Altagracia- Ancash	2		31,585e				
Yunguyo - Puno	2			34,345d			
CBS - Junin	2			34,475d			
AAHO - La Libertad	2			34,75d			
Moteado Beige - Junin	2				37,865c		
Cholo Fuerte - Ancash	2				38,9c		
H6 - Junin	2					40,915b	
Vicos - Ancash	2					41,105b	
Andenes - Cuzco	2						43,645a

Cuadro 13.3 Prueba de Tukey de proteína soluble de diez genotipos de lupino desamargado

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
CBS - Junin	2	18,195d					
Moteado Beige - Junin	2	18,38d					
H6 - Junin	2	18,845d	18,845d				
Altagracia- Ancash	2	19,655d	19,655d	19,655d			
AAHO - La Libertad	2		20,035d	20,035d			
Andenes - Cuzco	2		20,325d	20,325d			
Albus - Lima	2			20,49d			
Cholo Fuerte - Ancash	2				23,145c		
Vicos - Ancash	2					27,81b	
Yunguyo - Puno	2						33,3a

Cuadro 13.4 ANOVA de carbohidratos de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Carbohsol1	Inter-grupos	1615,943	9	179,549	85,326	,000
	Intra-grupos	42,085	20	2,104		
	Total	1658,028	29			
Carbohsol2	Inter-grupos	211,291	9	23,477	61,563	,000
	Intra-grupos	7,627	20	,381		
	Total	218,918	29			

Cuadro 13.5 Prueba de Tukey de carbohidratos de diez genotipos de lupino sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Moteado Beige - Junin	3	22,04c			
Yunguyo - Puno	3	22,48c			
Cholo Fuerte - Ancash	3	24,69c			
Altagracia - Ancash	3	25,42c			
Compuesto Blanco Semiprecoz - Junin	3	25,52c			
AAHO - La Libertad	3		30,29b		
Albus - Lima	3			35,87a	
Andenes - Cuzco	3			38,70a	38,70a
Vicos - Ancash	3				41,02a
H6 - Junin	3				41,08a

Cuadro 13.6 Prueba de Tukey de carbohidratos de diez genotipos de lupino desamargado

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Cholo Fuerte - Ancash	3	15,24c			
Albus - Lima	3	16,10c	16,10c		
Compuesto Blanco Semiprecoz - Junin	3	16,82c	16,8233		
Andenes - Cuzco	3	16,95c	16,95c		
Yunguyo - Puno	3		17,23c		
Moteado Beige - Junin	3		17,36c		
H6 - Junin	3			19,57b	
Vicos - Ancash	3			20,4b	
AAHO - La Libertad	3				22,32a
Altagracia - Ancash	3				23,66a

Cuadro 13.7 ANOVA de actividad antioxidante de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
AAT1	Inter-grupos	261866,092	9	29096,232	119,038	,000
	Intra-grupos	2444,290	10	244,429		
	Total	264310,382	19			
AAT2	Inter-grupos	9632,665	9	1070,296	75,351	,000
	Intra-grupos	142,042	10	14,204		
	Total	9774,707	19			

Cuadro 13.8 Prueba de Tukey de actividad antioxidante de diez genotipos de lupino sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
AAHO - La Libertad	2	375,245c					
Andenes - Cuzco	2		488,205b				
Cholo Fuerte - Ancash	2		536,73b	536,73b			
CBS - Junin	2			572,375b	572,375b		
Albus - Lima	2			591,16b	591,16b		
Yunguyo - Puno	2				609,795b		
Vicos - Ancash	2				622,3b	622,3b	
Altagracia- Ancash	2					678,505b	
Moteado Beige - Junin	2						759,875a
H6 - Junin	2						775,41a

Cuadro 13.9 Prueba de Tukey de actividad antioxidante de diez genotipos de lupino desamargado

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Albus - Lima	2	336,39c			
Andenes - Cuzco	2	337,81c			
AAHO - La Libertad	2	338,555c			
Altagracia- Ancash	2	342,135c			
Yunguyo - Puno	2	344,63c			
Cholo Fuerte - Ancash	2	347,24c			
Moteado Beige - Junin	2		363,905b		
Vicos - Ancash	2		373,615b	373,615b	
CBS - Junin	2			384,93b	
H6 - Junin	2				402,94a

Cuadro 13.10 ANOVA de alcaloides totales de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Alcaloides1	Inter-grupos	6,772	9	,752	27,603	,000
	Intra-grupos	,273	10	,027		
	Total	7,045	19			
Alcaloides2	Inter-grupos	,022	9	,002	,920	,545
	Intra-grupos	,027	10	,003		
	Total	,049	19			

Cuadro 13.11 Prueba de Tukey de alcaloides totales de diez genotipos de lupino sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Albus - Lima	2	,88b	
Andenes - Cuzco	2		2,39a
Cholo Fuerte - Ancash	2		2,41a
AAHO - La Libertad	2		2,45a
H6 - Junin	2		2,72a
Altagracia- Ancash	2		2,76a
Vicos - Ancash	2		2,79a
Moteado Beige - Junin	2		2,80a
CBS - Junin	2		2,96a
Yunguyo - Puno	2		2,98a

Cuadro 13.12 ANOVA de oligosacaridos de diez genotipos de lupino sin desamargar y desamargado

ANOVA de un factor						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Oligosacaridos1	Inter-grupos	404,211	9	44,912	85,838	,000
	Intra-grupos	10,464	20	,523		
	Total	414,676	29			
Oligosacaridos2	Inter-grupos	63,233	9	7,026	61,265	,000
	Intra-grupos	2,294	20	,115		
	Total	65,526	29			

Cuadro 13.13 Prueba de Tukey de oligosacaridos de diez genotipos de lupino sin desamargar

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Moteado Beige - Junin	3	14,82c			
Yunguyo - Puno	3	15,0733c			
Cholo Fuerte - Ancash	3	16,193c			
Altagracia - Ancash	3	16,503c			
Compuesto Blanco Semiprecoz - Junin	3	16,516c			
AAHO - La Libertad	3		19,10b		
Albus - Lima	3			21,63a	
Andenes - Cuzco	3			23,21a	23,21a
Vicos - Ancash	3				24,24a
H6 - Junin	3				24,45a

Cuadro 13.14 Prueba de Tukey de alcaloides totales de diez genotipos de lupino desamargado

Genotipo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Cholo Fuerte - Ancash	3	8,79c			
Albus - Lima	3	9,266c	9,2666c		
Compuesto Blanco Semiprecoz - Junin	3	9,6567	9,6566c		
Andenes - Cuzco	3	9,723c	9,723c		
Yunguyo - Puno	3		9,886c		
Moteado Beige - Junin	3		9,943c		
H6 - Junin	3			11,16b	
Vicos - Ancash	3			11,59b	
AAHO - La Libertad	3				12,67a
Altagracia - Ancash	3				13,4a

**ANEXO 14. CONTENIDO DE HUMEDAD Y EXTRACTO ETÉREO
DE HARINA DE LUPINO SIN DESAMARGAR Y DESAMARGADO**

El contenido de humedad de las harinas de lupino amargas y harinas desamargadas resultó en promedio 12% (sd \pm 0.1, duplicado) mediante el determinador de humedad infrarrojo con 0.5 g de muestra y 120°C por 2 minutos aprox. Por otro lado la data para el contenido de extracto etéreo de las ambas harinas por el método inmersión-agitación se muestra en los Cuadros 14.1 y 14.2.

Cuadro 14.1. Contenido de extracto etéreo de harina de lupino amargo por el método inmersión-agitación

Lupino amargo		Peso inicial (g)	Peso final (g)	Pi-Pf (g)	Extracto etéreo (%) bh	Extracto etéreo (%) bs
AAHO	LIB	5	3.6248	1.3752	27.504	31.2540
Altagracia	ANC	5	4.2145	0.7855	15.710	17.8520
Cholo fuerte	ANC	5	3.7280	1.2720	25.441	28.9100
Vicos	ANC	5	3.7810	1.2190	24.380	27.7040
H6	JUN	5	3.6591	1.3409	26.819	30.4760
Moteado Beige	JUN	5	4.2162	0.7838	15.676	17.8140
Comp. Blanco Sem	JUN	5	4.2550	0.7450	14.900	16.9320
Andenes	CUZ	5	4.1446	0.8554	17.109	19.4420
Yunguyo	PUN	5	4.1872	0.8128	16.255	18.4720
<i>L. albus</i>	LIM	5	4.4281	0.5719	11.438	12.9980

*n=2; Pi= peso inicial, Pf= peso final

Cuadro 14.2. Contenido de extracto etéreo de harina de lupino desamargado por el método inmersión-agitación

Lupino desamargado		Peso inicial (g)	Peso final (g)	Pi-Pf (g)	Extracto etéreo (%) bh	Extracto etéreo (%) bs
AAHO	LIB	5	4.025	0.975	19.494	22.152
Altagracia	ANC	5	4.028	0.972	19.432	22.082
Cholo fuerte	ANC	5	4.050	0.950	19.008	21.600
Vicos	ANC	5	4.245	0.755	15.096	17.154
H6	JUN	5	4.010	0.990	19.800	22.500
Moteado Beige	JUN	5	4.079	0.921	18.417	20.928
Comp. Blanco Sem	JUN	5	4.029	0.971	19.422	22.070
Andenes	CUZ	5	4.053	0.947	18.941	21.524
Yunguyo	PUN	5	4.019	0.981	19.617	22.292
<i>L. albus</i>	LIM	5	4.010	0.990	19.800	22.500

*n=2; Pi= peso inicial, Pf= peso final

**ANEXO 15. REGISTRO DE DATOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO**

1. CURVA PATRON DE TROLOX

Cuadro 15.1. Base de datos para curva patrón de trolox

Trolox (mg Trolox /100mL)	Absorbancias (517 nm)			Abs	Desv	Coef Var
	R1	R2	R3	Promedio	Estándar	(%)
0.1	0.64	0.659	0.66	0.653	0.011	0.004
0.2	0.52	0.595	0.56	0.558	0.038	0.021
0.3	0.41	0.32	0.48	0.403	0.080	0.080
0.4	0.294	0.278	0.273	0.282	0.011	0.004
0.5	0.18	0.162	0.15	0.164	0.015	0.008

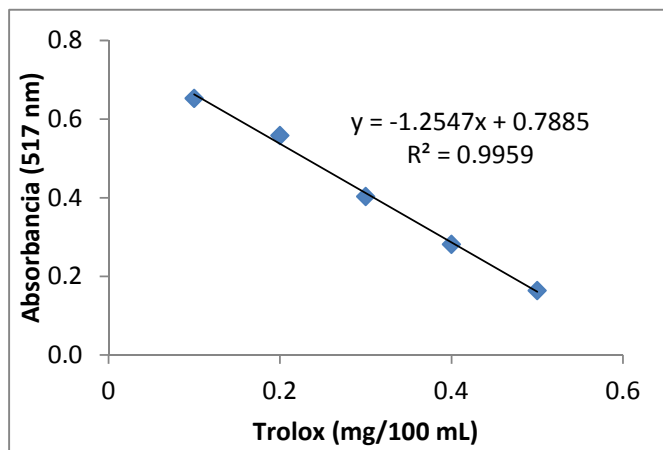


Figura 15.1. Curva patrón de trolox

Blanco teorico (Abs) = 0.788

Abs blanco (Abs) = 0.394 (mitad del theoretical blank)

Trolox pendiente = -1.254 Abs/mg Trolox (pendiente de curva patrón)

Factor trolox = 391 546 umol ET / 100 g trolox

2. ABSORBANCIAS DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO POR EL MÉTODO DE DPPH DIRECTO

Cuadro 15.2. Absorbancias de diez genotipos de lupino crudo por el metodo DPPH directo

Lupino inicial	Abs Repeticion 1 (517 nm)			Abs Repeticion 2 (517 nm)			Abs PROMEDIO (517 nm)			Desviacion estandar		
	p1	p2	p3	p1	p2	p3	p1	p2	p3	p1	p2	p3
AAHO	0.547	0.390	0.294	0.553	0.394	0.296	0.550	0.392	0.295	0.0039	0.0028	0.0021
Altagracia	0.403	0.301	0.225	0.399	0.299	0.223	0.401	0.300	0.224	0.0028	0.0021	0.0016
Cholo fuerte	0.418	0.360	0.323	0.414	0.356	0.319	0.416	0.358	0.321	0.0029	0.0025	0.0023
Vicos	0.408	0.316	0.192	0.404	0.312	0.190	0.406	0.314	0.191	0.0029	0.0022	0.0013
H6	0.392	0.312	0.262	0.388	0.308	0.260	0.390	0.310	0.261	0.0027	0.0022	0.0018
Moteado Beige	0.385	0.288	0.209	0.389	0.290	0.211	0.387	0.289	0.210	0.0027	0.0020	0.0015
Comp. Blanco Sem	0.427	0.308	0.224	0.431	0.312	0.226	0.429	0.310	0.225	0.0030	0.0022	0.0016
Andenes	0.463	0.343	0.203	0.467	0.347	0.205	0.465	0.345	0.204	0.0033	0.0024	0.0014
Yunguyo	0.408	0.323	0.242	0.412	0.327	0.244	0.410	0.325	0.243	0.0029	0.0023	0.0017
ALBUS	0.413	0.334	0.214	0.409	0.330	0.212	0.411	0.332	0.213	0.0029	0.0023	0.0015

P = peso de muestra

Cuadro 15.3. Absorbancias de diez genotipos de lupino desamargados por el metodo DPPH directo

Lupino desamargado	Abs Repeticion 1 (517 nm)			Abs Repeticion 2 (517 nm)			Abs PROMEDIO (517 nm)			Desviacion estandar		
	p1	p2	p3	p1	p2	p3	p1	p2	p3	p1	p2	p3
AAHO	0.533	0.443	0.328	0.539	0.447	0.332	0.536	0.445	0.330	0.0038	0.0031	0.0023
Altagracia	0.607	0.434	0.317	0.601	0.430	0.313	0.604	0.432	0.315	0.0042	0.0030	0.0022
Cholo fuerte	0.489	0.415	0.354	0.485	0.411	0.350	0.487	0.413	0.352	0.0034	0.0029	0.0025
Vicos	0.504	0.416	0.313	0.500	0.412	0.309	0.502	0.414	0.311	0.0035	0.0029	0.0022
H6	0.525	0.387	0.266	0.519	0.383	0.264	0.522	0.385	0.265	0.0037	0.0027	0.0019
Moteado Beige	0.541	0.413	0.301	0.547	0.417	0.305	0.544	0.415	0.303	0.0038	0.0029	0.0021
Comp. Blanco Sem	0.522	0.384	0.298	0.528	0.388	0.300	0.525	0.386	0.299	0.0037	0.0027	0.0021
Andenes	0.540	0.457	0.318	0.546	0.461	0.322	0.543	0.459	0.320	0.0038	0.0032	0.0023
Yunguyo	0.470	0.422	0.349	0.474	0.426	0.353	0.472	0.424	0.351	0.0033	0.0030	0.0025
ALBUS	0.566	0.429	0.340	0.560	0.425	0.336	0.563	0.427	0.338	0.0040	0.0030	0.0024

P = peso de muestra

3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO POR METODO DDPH (Plank et al., 2012)

Cuadro 15.4. Actividad Antioxidante de diez genotipos de lupino amargo por el método DPPH

Lupino amargo	ATT ($\mu\text{mol ET}/100\text{gm})\text{bs}$		Promedio (%)	Desv Estándar	IC (+)	IC (-)
	R1	R2				
AAHO	377.41	373.08	375.25	3.05753	27.457	-27.457
Altagracia	667.42	689.59	678.50	15.67585	140.773	-140.773
Cholo fuerte	523.01	550.45	536.73	19.40690	174.279	-174.279
Vicos	613.74	630.86	622.30	12.10085	108.669	-108.669
H6	754.91	795.91	775.41	28.99648	260.396	-260.396
Moteado Beige	774.16	745.59	759.87	20.20552	181.451	-181.451
Comp. Blanco Sem	579.77	564.98	572.38	10.46039	93.937	-93.937
Andenes	491.56	484.85	488.21	4.74549	42.616	-42.616
Yunguyo	618.46	601.13	609.80	12.25760	110.076	-110.076
ALBUS	582.93	599.39	591.16	11.64179	104.546	-104.546
Promedio (L. mutabilis)	563.27	550.32	556.79			

Cuadro 15.5. Actividad Antioxidante de diez genotipos de lupino desamargado por el método DPPH

Lupino desamargado	ATT ($\mu\text{mol ET}/100\text{gm})\text{bs}$		Promedio (%)	Desv Estándar	IC (+)	IC (-)
	R1	R2				
AAHO	341.01	336.10	338.55	3.47014	31.163	-31.163
Altagracia	340.87	343.40	342.13	1.79150	16.088	-16.088
Cholo fuerte	343.42	351.06	347.24	5.40859	48.571	-48.571
Vicos	370.67	376.56	373.61	4.16805	37.430	-37.430
H6	400.75	405.13	402.94	3.09332	27.779	-27.779
Moteado Beige	366.22	361.59	363.91	3.27532	29.413	-29.413
Comp. Blanco Sem	387.81	382.05	384.93	4.07487	36.593	-36.593
Andenes	339.84	335.78	337.81	2.86589	25.736	-25.736
Yunguyo	348.19	341.07	344.63	5.03394	45.206	-45.206
ALBUS	334.18	338.60	336.39	3.12388	28.053	-28.053
Promedio (L. mutabilis)	358.61	352.97	355.79			

**ANEXO 16. REGISTRO DE DATOS DE PROTEÍNA SOLUBLE
DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO**

1. CURVA PATRÓN DE BSA

Cuadro 16.1. Base de datos para curva patrón de BSA

BSA (ug/mL)	REPETICION			Promedi
	R1	R2	R3	
0				0.0000
25	0.012		0.039	0.0255
125	0.128	0.139	0.14	0.1357
250	0.207	0.209	0.221	0.2123
500	0.453	0.452		0.4525
750	0.637	0.635		0.6360
1000	0.875	0.743	0.78	0.7993
1500	0.927	0.937	0.86	0.8000
2000	1.137	1.13		1.1335

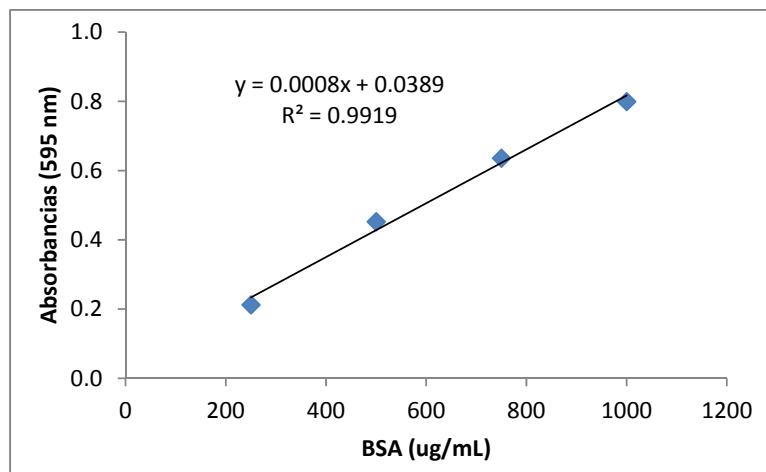


Figura 16.1 Curva patrón de BSA

La curva mostrada en la Figura C-4.1. fue obtenida solo en el rango de 250 a 1000 ug/mL (4 puntos) con absorbancias de 0.2 a 0.8 y $R^2 = 0.99$, e intercepta en cero, lo cual respeta la ley de Beer. Algunos puntos del Cuadro D-2.1 fueron eliminados para minimizar mejorar el valor R.

2. ABSORBANCIAS DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Cuadro 16.2. Absorbancias de diez genotipos de lupino crudo para proteína soluble por método Bradford

Lupino amargo	ORIGEN	ABS DIL (1:80)		Promedi	Desvest Estándar	Coef Var (%)
		R1	R2			
<i>L. mutabilis</i> var. AAHO	LIB	0.278	0.281	0.280	0.0018	0.6308
<i>L. mutabilis</i> var. Altagracia	ANC	0.270	0.265	0.267	0.0033	1.2434
<i>L. mutabilis</i> var. Cholo Fuerte	ANC	0.314	0.319	0.317	0.0034	1.0889
<i>L. mutabilis</i> var. VICOS	ANC	0.343	0.337	0.340	0.0043	1.2706
<i>L. mutabilis</i> var. H6	JUN	0.323	0.327	0.325	0.0026	0.8138
<i>L. mutabilis</i> var. Moteado Beige	JUN	0.311	0.315	0.313	0.0025	0.7981
<i>L. mutabilis</i> var. Compuesto Blanco Semiprecoz	JUN	0.293	0.289	0.291	0.0031	1.0525
<i>L. mutabilis</i> var. Andenes	CUZ	0.350	0.346	0.348	0.0026	0.7597
<i>L. mutabilis</i> var. Yunguyo	PUN	0.287	0.284	0.285	0.0024	0.8470
<i>L. albus</i> UA-2013	LIM	0.233	0.239	0.236	0.0037	1.5750
Sacha Inchi Semilla		0.218	0.217	0.217	0.0004	0.1612

R = repetición

Cuadro 16.3. Absorbancias de diez genotipos de lupino desamargados para proteína soluble por método Bradford

Lupino desamargado	ORIGEN	ABS DIL (1:80)		Promedi	Desvest Estándar	Coef Var (%)
		R1	R2			
<i>L. mutabilis</i> var. AAHO	LIB	0.179	0.173	0.176	0.0042	2.3783
<i>L. mutabilis</i> var. Altagracia	ANC	0.175	0.172	0.174	0.0018	1.0248
<i>L. mutabilis</i> var. Cholo Fuerte	ANC	0.196	0.201	0.199	0.0037	1.8481
<i>L. mutabilis</i> var. VICOS	ANC	0.240	0.243	0.242	0.0024	0.9760
<i>L. mutabilis</i> var. H6	JUN	0.170	0.165	0.167	0.0041	2.4570
<i>L. mutabilis</i> var. Moteado Beige	JUN	0.168	0.165	0.167	0.0019	1.1395
<i>L. mutabilis</i> var. Compuesto Blanco Semiprecoz	JUN	0.166	0.161	0.164	0.0032	1.9420
<i>L. mutabilis</i> var. Andenes	CUZ	0.178	0.181	0.179	0.0020	1.0878
<i>L. mutabilis</i> var. Yunguyo	PUN	0.268	0.265	0.267	0.0022	0.8411
<i>L. albus</i> UA-2013	LIM	0.179	0.178	0.179	0.0009	0.5272

R = repetición

3. PROTEÍNA SOLUBLE DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO POR MÉTODO DE BRADFORD

Cuadro 16.4. Proteína soluble de diez genotipos de lupino sin desamargar por método Bradford

Lupino sin desamargar	Proteína soluble (%)		Promedio Repeticion	Desv Sta Repeticion	Coef Var Repeticion
	R1	R2			
AAHO	34.569	34.929	34.749	0.25462	0.73
Altagracia	31.910	31.260	31.585	0.45962	1.46
Cholo fuerte	38.561	39.244	38.902	0.48298	1.24
Vicos	41.523	40.689	41.106	0.58974	1.43
H6	40.646	41.181	40.913	0.37817	0.92
Moteado Beige	37.622	38.110	37.866	0.34513	0.91
Comp. Blanco Sem	34.773	34.180	34.476	0.41889	1.21
Andenes	43.911	43.383	43.647	0.37329	0.86
Yunguyo	34.583	34.107	34.345	0.33681	0.98
ALBUS	26.312	27.023	26.667	0.50289	1.89
Sacha Inchi semilla	37.669	37.564	37.617	0.07384	0.20
Promedio (L. mutabilis)	37.76	37.22	37.490		
Desv Estándar (L. mutabilis)	5.33	5.33	5.333		
Coef Var (%) L. mutabilis	14.12	14.33	14.226		

*Datos de cálculo: Curva: $y=0.0008 + 0.0389x$; FD = 80; incluye extracto etéreo; 1mL de extracto; 100 mg muestra

Cuadro 16.5. Proteína soluble de diez genotipos de lupino desamargados

Lupino desamargado	Proteína soluble (%)		Promedio Repeticion	Desv Sta Repeticion	Coef Var Repeticion
	R1	R2			
AAHO	20.47	19.60	20.03	0.61150	3.05
Altagracia	19.84	19.47	19.65	0.25954	1.32
Cholo fuerte	22.77	23.52	23.15	0.53200	2.30
Vicos	27.58	28.04	27.81	0.32350	1.16
H6	19.27	18.42	18.84	0.60311	3.20
Moteado Beige	18.57	18.19	18.38	0.27313	1.49
Comp. Blanco Sem	18.52	17.87	18.19	0.46348	2.55
Andenes	20.13	20.52	20.32	0.28238	1.39
Yunguyo	33.53	33.07	33.30	0.32790	0.98
ALBUS	20.59	20.39	20.49	0.13810	0.67
Promedio (L. mutabilis)	22.69	22.41	22.55		
Desv Estándar (L. mutabilis)	7.27	7.20	7.23		
Coef Var (%) L. mutabilis	32.03	32.14	32.07		

*Datos de cálculo: Curva: $y=0.0008 + 0.0389x$; FD = 80; incluye extracto etéreo; 1mL de extracto; 100 mg muestra

3. SECUENCIA DE CALCULOS PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE LUPINO POR METODO DE BRADFORD

Cuadro 16.6. Data de cálculos de proteína soluble de lupino crudo

CALCULOS PROTEINA SOLUBLE	LUPINO INICIAL										
	AAHO	ALT	CHF	VICOS	H6	MB	CBS	AND	YY	ALBUS	SIS
Absorbancia 490nm	0.280	0.267	0.317	0.340	0.325	0.313	0.291	0.348	0.285	0.236	0.217
BSA (ug/mL)	301.0	285.4	347.0	376.6	357.9	342.3	315.0	386.8	308.0	246.4	223.0
BSA (mg/mL)	0.301	0.285	0.347	0.377	0.358	0.342	0.315	0.387	0.308	0.246	0.223
FD (mg/mL)	24.08	22.83	27.76	30.13	28.63	27.39	25.20	30.94	24.64	19.71	17.84
BSA (g/100 gm) bh	24.08	22.83	27.76	30.13	28.63	27.39	25.20	30.94	24.64	19.71	17.84
Humedad (%)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7
Protein (g/100 gm) bs	27.36	25.95	31.55	34.24	32.54	31.12	28.64	35.16	28.00	22.40	19.18
Grasa (%)	21.25	17.85	18.91	16.70	20.47	17.81	16.93	19.44	18.47	16.00	49.00
Protein (g/100 gm) bs	34.75	31.59	38.90	41.11	40.91	37.87	34.48	43.65	34.34	26.67	37.62

¹n=2; ²y=0.0008 + 0.0389; ³FD = 1 y 80; ⁴ 1mL extracto es 100 mg muestra; ⁵muestra entera; ⁶SIS = sachá inchi semilla

Cuadro 16.7 Data de cálculos de proteína soluble de lupino desamargado

CALCULOS PROTEINA SOLUBLE	LUPINO DESAMARGADO									
	AAHO	ALT	CHF	VICOS	H6	MB	CBS	AND	YY	ALBUS
Absorbancia 490nm	0.176	0.174	0.199	0.242	0.167	0.167	0.164	0.179	0.267	0.179
BSA (ug/mL)	171.6	168.4	199.6	253.4	160.6	159.9	156.0	175.5	284.6	174.7
BSA (mg/mL)	0.172	0.168	0.200	0.253	0.161	0.160	0.156	0.175	0.285	0.175
FD (mg/mL)	13.72	13.47	15.97	20.27	12.85	12.79	12.48	14.04	22.77	13.97
BSA (g/100 gm) bh	13.72	13.47	15.97	20.27	12.85	12.79	12.48	14.04	22.77	13.97
Humedad (%)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Protein (g/100 gm) bs	15.6	15.3	18.1	23.0	14.6	14.5	14.2	16.0	25.9	15.9
Grasa (%)	22.15	22.08	21.60	17.15	22.50	20.93	22.07	21.52	22.29	22.50
Protein (g/100 gm) bs	20.03	19.65	23.15	27.81	18.84	18.38	18.19	20.32	33.30	20.49

¹n=2; ²y=0.0008 + 0.0389; ³FD = 1 y 80; ⁴ 1mL extracto es 100 mg muestra; ⁵muestra entera

CBS = Compuesto Blanco Semiprecoz
 ALT = Altagracia
 MB = Moteado Beige
 AND = Andenes
 VICOS = Vicos

H6 = H6
 CHF = Cholo Fuerte
 AAHO = AAHO
 YY = Yunguyo
 ALBUS = Tarwi Dulce (L. albus)

4. DATA COMPARATIVA DE PROTEÍNA CRUDA Y PROTEÍNA SOLUBLE DEL LUPINO

Cuadro 16.4. Comparación de proteína soluble y proteína cruda de lupino

Lupino	ORIGEN	Proteína cruda (%)		Proteína soluble (%)	
		L. sin desamargar	L. desamargado	L. sin desamargar	L. desamargado
LM. var. AAHO	LIB	46.91	49.59	34.75	20.03
LM. var. Altagracia	ANC	40.89	50.11	31.59	19.65
LM. var. Cholo Fuerte	ANC	42.29	48.26	38.90	23.15
LM. var. VICOS	ANC	43.60	46.21	41.11	27.81
LM. var. H6	JUN	41.25	53.10	40.91	18.84
LM. var. Moteado Beige	JUN	43.88	49.46	37.87	18.38
LM. var. Compuesto Blanco Semiprecoz	JUN	41.37	50.69	34.48	18.19
LM. var. Andenes	CUZ	45.38	42.77	43.65	20.32
LM. var. Yunguyo	PUN	41.42	45.53	34.34	33.30
LA. var. UA-2013	LIM	30.51	35.79	26.67	20.49

^a promedio (n= 2); ^b promedio (n=2)

ANEXO 17. REGISTRO DE DATOS DE CARBOHIDRATOS TOTALES Y OLIGOSACÁRIDOS DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO DETERMINADO POR METODO FENOL ÁCIDO SULFÚRICO

1. CURVA PATRÓN DE GLUCOSA (LUPINO SIN DESAMARGAR)

Cuadro 17.1. Base de datos para curva patrón de glucosa para lupino sin desamargar

Glucosa mg/mL	Absorbancias (490 nm)			Absorbancia Promedio	Desviacion Estándar	Coef Var (%)
	R1	R2	R3			
0				0,00		
1	0,067	0,09	0,115	0,09	0,0240	26,5
2	0,261	0,133		0,20	0,0905	45,9
4		0,359	0,388	0,37	0,0205	5,5
6	0,527	0,552	0,431	0,50	0,0639	12,7
8	0,743	0,734	0,588	0,69	0,0870	12,6
10		0,834	0,83	0,83	0,0028	0,3

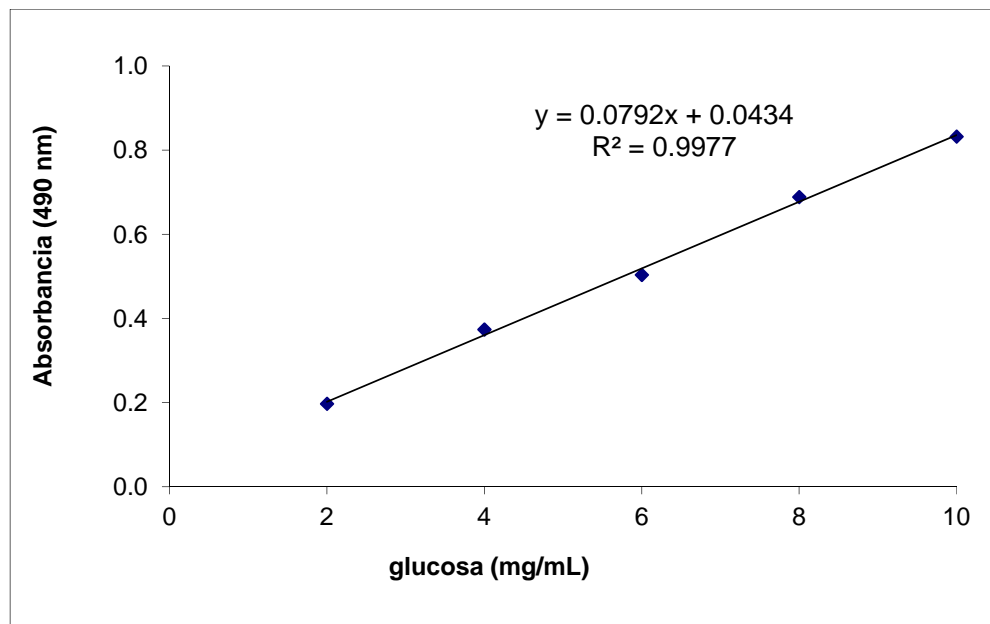


Figura 17.1. Curva patrón de glucosa para lupino sin desamargar

La curva mostrada en la Figura 17.1 fue obtenida en el rango de 2 a 10 mg/mL (5 puntos) con absorbancias de 0.2 a 0.84 y $R^2 = 0.99$ e intercepta en cero, lo cual cumple la ley de Lambert-Beer.

2. CURVA PATRÓN DE OLIGOSACÁRIDOS (LUPINO SIN DESAMARGAR)

Cuadro 17.2 Base de datos para curva patrón de Manosa:Galactosa (Oligosacáridos)
Lupino sin desamargar

Man:Gal mg/mL	Absorbancias (490 nm)			Absorbancia Promedio	Desviacion Estándar	Coef Var (%)
	R1	R2	R3			
0				0,00		
1	0,194	0,203	0,15	0,18	0,0284	15,55
2	0,302	0,331	0,229	0,29	0,0526	18,29
3	0,52	0,466	0,375	0,45	0,0733	16,15
4	0,703	0,59	0,575	0,62	0,0700	11,24
5	0,865	0,75	0,81	0,81	0,0575	7,12

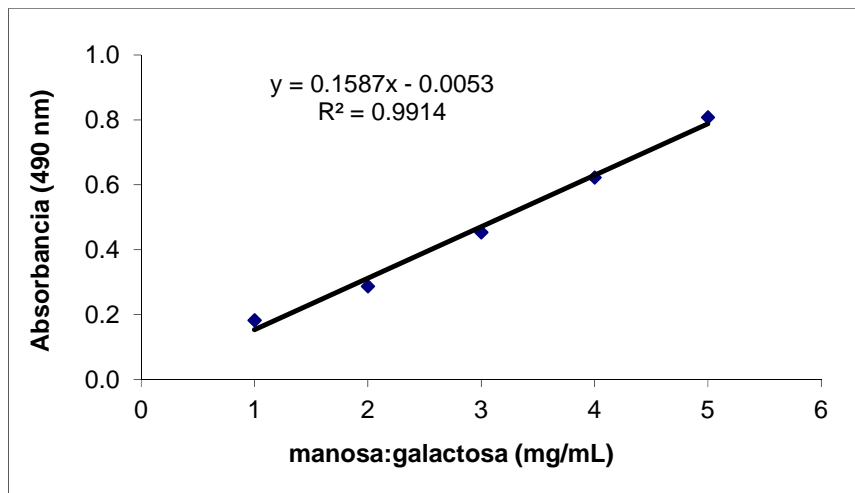


Figura 17.2 Curva patrón de Manosa:Galactosa (Oligosacáridos) para lupino sin desamargar

La curva mostrada en la Figura 17.2 fue obtenida en el rango de 1 a 5 mg/mL (5 puntos) con absorbancias de 0.2 a 0.8 y $R^2 = 0.99$ e intercepta en cero, lo cual cumple la ley de Lambert-Beer.

3. ABSORBANCIAS DE DIEZ GENOTIPOS DE L. SIN DESAMARGAR POR METODO FENOL ÁCIDO SULFÚRICO

Cuadro 17.3 Absorbancias de diez genotipos de lupino sin desamargar

Lupino inicial	ORIGEN	Abs (490 nm)			Prom Abs	Desv Estándar	Coef Variación
		R1	R2	R3			
<i>L. mutabilis</i> var. AAHO	LIB	0,229	0,228	0,227	0,228	0,001	0,337
<i>L. mutabilis</i> var. Altagracia	ANC	0,210	0,200	0,206	0,205	0,005	2,468
<i>L. mutabilis</i> var. Cholo Fuerte	ANC	0,205	0,188	0,202	0,198	0,009	4,496
<i>L. mutabilis</i> var. VICOS	ANC	0,318	0,310	0,296	0,308	0,011	3,591
<i>L. mutabilis</i> var. H6	JUN	0,295	0,311	0,283	0,296	0,014	4,656
<i>L. mutabilis</i> var. Moteado Beige	JUN	0,185	0,180	0,187	0,184	0,004	1,990
<i>L. mutabilis</i> var. Compuesto Blanco Semiprecoz	JUN	0,213	0,203	0,207	0,208	0,005	2,499
<i>L. mutabilis</i> var. Andenes	CUZ	0,282	0,298	0,275	0,285	0,012	4,299
<i>L. mutabilis</i> var. Yunguyo	PUN	0,189	0,176	0,191	0,185	0,008	4,380
<i>L. albus</i> UA-2013	LIM	0,281	0,287	0,262	0,277	0,013	4,651

*No hay dilución, R, repetición.

4. CARBOHIDRATOS Y OLIGOSACÁRIDOS DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO SIN DESAMARGAR POR METODO FENOL ÁCIDO SULFÚRICO

Cuadro 17.4 Carbohidratos de lupino sin desamargar

Lupino	Carbohidratos (%) bs			Promedio (%)	Desv Estándar	Coef Var (%)	IC (+)	IC (-)
	R1	R2	R3					
AAHO	30,41	30,32	30,16	30,30	0,12596	0,42	0,31	-0,31
Altagracia	26,16	24,58	25,53	25,42	0,79562	3,13	1,98	-1,98
Cholo fuerte	25,71	23,07	25,30	24,70	1,42118	5,75	3,53	-3,53
Vicos	42,57	41,33	39,18	41,03	1,71494	4,18	4,26	-4,26
H6	40,93	43,40	38,93	41,09	2,24129	5,45	5,56	-5,56
Moteado Beige	22,24	21,40	22,50	22,04	0,57435	2,61	1,43	-1,43
Comp. Blanco Sem	26,38	24,77	25,42	25,52	0,80655	3,16	2,00	-2,00
Andenes	38,20	40,87	37,05	38,71	1,96283	5,07	4,87	-4,87
Yunguyo	23,06	21,01	23,39	22,49	1,28616	5,72	3,19	-3,19
ALBUS	36,53	37,45	33,65	35,87	1,97883	5,52	4,91	-4,91
Sacha Inchi semilla	32,55	33,04	31,65	32,41	0,70117	2,16	1,74	-1,74
Sacha Inchi torta	32,43	32,79	33,69	32,97	0,64737	1,96	1,61	-1,61

R = repeticion, IC = Intervalo de confianza al 95%

Cuadro 17.5 Oligosacáridos de lupino sin desamargar

Lupino inicial	Oligosacaridos (%) bs			Promedio (%)	Desv Estándar	Coef Var (%)	IC (+)	IC (-)
	R1	R2	R3					
AAHO	19,16	19,12	19,04	19,11	0,06286	0,33	0,16	-0,16
Altagracia	16,87	16,08	16,56	16,51	0,39706	2,41	0,99	-0,99
Cholo fuerte	16,70	15,38	16,50	16,19	0,70925	4,38	1,76	-1,76
Vicos	25,01	24,39	23,32	24,24	0,85585	3,53	2,12	-2,12
H6	24,37	25,61	23,37	24,45	1,11852	4,57	2,78	-2,78
Moteado Beige	14,92	14,50	15,04	14,82	0,28663	1,93	0,71	-0,71
Comp. Blanco Sem	16,94	16,14	16,47	16,52	0,40251	2,44	1,00	-1,00
Andenes	22,96	24,29	22,39	23,21	0,97956	4,22	2,43	-2,43
Yunguyo	15,36	14,34	15,52	15,07	0,64186	4,26	1,59	-1,59
ALBUS	21,96	22,42	20,53	21,64	0,98755	4,56	2,45	-2,45
Sacha Inchi semilla	22,06	22,31	21,62	22,00	0,34992	1,59	0,87	-0,87
Sacha Inchi torta	21,41	21,60	22,04	21,68	0,32307	1,49	0,80	-0,80

R = repeticion, IC = Intervalo de confianza al 95%

5. SECUENCIA DE CALCULOS DE CARBOHIDRATOS Y OLIGOSACARIDOS DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO SIN DESAMARGAR

Cuadro 17.6 Data de cálculos de carbohidratos de lupino sin desamargar

CALCULOS GLUCOSA Y/O CARBOH	LUPINO SIN DESAMARGAR									
	AAHO	ALT	CHF	VICOS	H6	MB	CBS	AND	YY	ALBUS
Absorbancia 490nm ¹	0,228	0,205	0,198	0,308	0,296	0,184	0,208	0,285	0,185	0,277
Glucosa (mg/mL) ²	2,33	2,04	1,96	3,34	3,20	1,77	2,07	3,05	1,79	2,95
FD (mg/9mL) ³	21,00	18,38	17,62	30,07	28,76	15,94	18,66	27,44	16,13	26,52
Glucosa (g/100 gm) bh	21,00	18,38	17,62	30,07	28,76	15,94	18,66	27,44	16,13	26,52
Humedad (%)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Glucosa (g/100 gm) bs	23,9	20,9	20,0	34,2	32,7	18,1	21,2	31,2	18,3	30,1
Grasa (%)	21,254	17,852	18,91	16,704	20,47	17,814	16,93	19,442	18,47	15,998
Glucosa (g/100 gm) bs	30,30	25,42	24,70	41,03	41,09	22,04	25,52	38,71	22,49	35,87

¹Absorbancias promedio (n=3); ²y = 0.0792x + 0.0434; ³FD multiplicado por 9 mL de extracto equivalencia 9mL de extracto por 100 mg de muestra.

Cuadro 17.7 Data de cálculos de oligosacáridos de lupino crudo

CALCULOS OLIGOSACARIDOS	LUPINO SIN DESAMARGAR									
	AAHO	ALT	CHF	VICOS	H6	MB	CBS	AND	YY	ALBUS
Absorbancia 490nm ¹	0,228	0,205	0,198	0,308	0,296	0,184	0,208	0,285	0,185	0,277
Mn:Gal (mg/mL) ²	1,5	1,3	1,3	2,0	1,9	1,2	1,341	1,8	1,2	1,8
FD (mg/9mL)	13,24	11,93	11,56	17,77	17,11	10,72	12,07	16,46	10,81	16,00
Mn:Gal (g/100 gm) bh	13,24	11,93	11,56	17,77	17,11	10,72	12,07	16,46	10,81	16,00
Humedad (%)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mn:Gal (g/100 gm) bs	15,0	13,6	13,1	20,2	19,4	12,2	13,7	18,7	12,3	18,2
Grasa (%)	21,254	17,852	18,91	16,704	20,47	17,814	16,93	19,442	18,47	15,998
Mn:Gal (g/100 gm) bs	19,11	16,51	16,19	24,24	24,45	14,82	16,52	23,21	15,07	21,64

¹Absorbancias promedio (n=3); ²y = 0.1587x - 0.0053; ³FD multiplicado por 9 mL de extracto; ⁴ equivalencia 9mL extracto por 100 mg de muestra.

CBS = Compuesto Blanco Semiprecoz

ALT = Altagracia

MB = Moteado Beige

AND = Andenes

VICOS = Vicos

H6 = H6

CHF = Cholo Fuerte

AAHO = AAHO

YY = Yunguyo

DU = Tarwi Dulce (L. albus)

6. CURVA PATRÓN DE GLUCOSA (LUPINO DESAMARGADO)

Cuadro 17.8 Base de datos para curva patrón de glucosa para Lupino desamargado

Glucosa mg/mL	Absorbancias (490 nm)			Absorbancia Promedio	Desviacion Estándar	Coef Var (%)
	R1	R2	R3			
0				0,00		
1	0,024	0,061	0,04	0,04	0,0186	44,5
2	0,144	0,185	0,18	0,17	0,0224	13,2
4	0,322	0,261	0,305	0,30	0,0315	10,6
6	0,495	0,532	0,409	0,48	0,0631	13,2
8	0,595	0,613	0,487	0,57	0,0681	12,1
10	0,783	0,661		0,72	0,0863	11,9

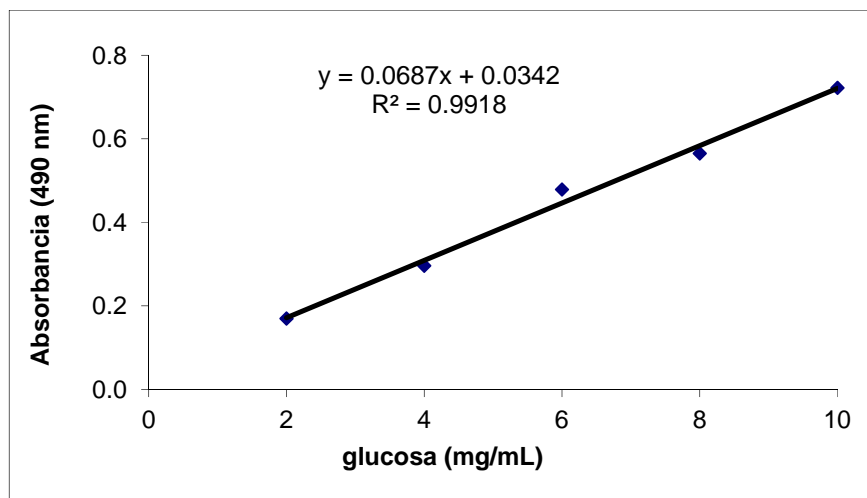


Figura 17.3 Curva patrón de glucosa para lupino desamargado

La curva mostrada en la Figura 17.3 fue obtenida en el rango de 2 a 10 mg/mL (7 puntos) con absorbancias de 0.2 a 0.7 y $R^2 = 0.99$, e intercepta en cero, lo cual respeta la ley de Beer.

7. CURVA PATRON DE OLIGOSACARIDOS (LUPINO DESAMARGADO)

Cuadro 17.9 Base de datos para curva patrón de Manosa:Galactosa (Oligosacáridos)
Lupino desamargado

Man:Gal mg/mL	Absorbancias (490 nm)			Absorbancia Promedio	Desviacion Estándar	Coef Var (%)
	R1	R2	R3			
0				0,00		
1	0,127	0,103	0,091	0,11	0,0183	17,13
2	0,284		0,237	0,26	0,0332	12,76
3	0,435	0,46	0,397	0,43	0,0317	7,37
4		0,544	0,521	0,53	0,0163	3,05
5	0,641	0,634	0,66	0,65	0,0135	2,09

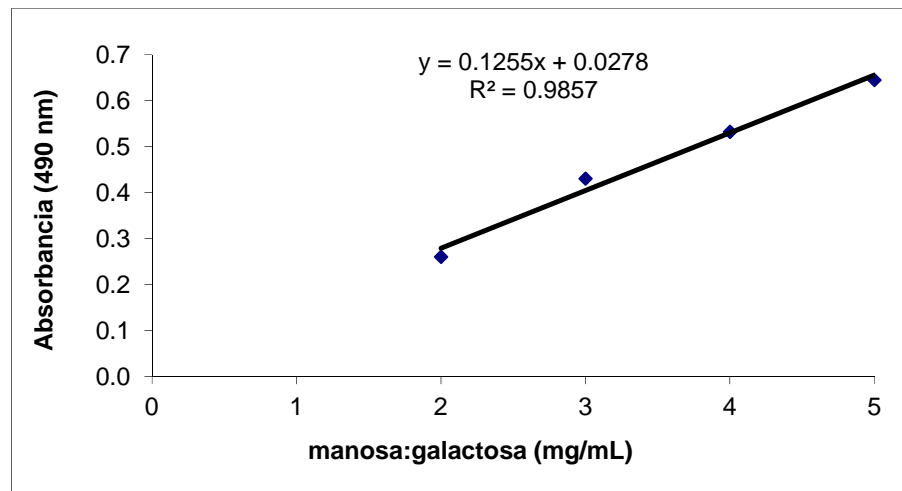


Figura 17.4 Curva patrón de Manosa:Galactosa (Oligosacáridos) para lupino desamargado

La curva mostrada en la Figura 17.4 fue obtenida en el rango de 2 a 5 mg/mL (4 puntos) con absorbancias de 0.2 a 0.65 y $R^2 = 0.99$, e intercepta en cero lo cual respeta la ley de Beer.

8. ABSORBANCIAS DE DIEZ GENOTIPOS DE L. DESAMARGADO

Cuadro 17.10 Absorbancias de diez genotipos de lupino desamargado determinados por método fenol ácido sulfúrico

Lupino inicial	ORIGEN	Abs (490 nm)			Prom Abs	Desv Estándar	Coef Variacion
		R1	R2	R3			
AAHO	LIB	0,213	0,207	0,208	0,209	0,003	1,443
Altagracia	ANC	0,210	0,219	0,232	0,220	0,011	4,981
Cholo Fuerte	ANC	0,156	0,156	0,152	0,155	0,003	1,625
VICOS	ANC	0,200	0,204	0,210	0,204	0,005	2,493
H6	JUN	0,190	0,188	0,184	0,187	0,003	1,615
Moteado Beige	JUN	0,171	0,172	0,175	0,173	0,002	1,285
Compuesto Blanco Semiprecoz	JUN	0,168	0,159	0,172	0,166	0,007	4,000
Andenes	CUZ	0,168	0,169	0,168	0,168	0,001	0,498
Yunguyo	PUN	0,165	0,172	0,171	0,169	0,004	2,270
<i>L. albus</i> UA-2013	LIM	0,162	0,159	0,159	0,160	0,002	1,048

Las absorbancias obtenidas fueron de muestras sin diluir

9. CARBOHIDRATOS Y OLIGOSACARIDOS DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO DESAMARGADO

Cuadro 17.11 Carbohidratos de diez genotipos de lupino desamargado por Método fenol ácido sulfúrico

Lupino desamargado	Carbohidratos (%) bs			Promedio (%)	Desv Estándar	Coef Var (%)	IC (+)	IC (-)
	R1	R2	R3					
AAHO	22,76	22,02	22,20	22,33	0,38518	1,73	0,96	-0,96
Altagracia	22,37	23,48	25,14	23,66	1,39573	5,90	3,47	-3,47
Cholo fuerte	15,43	15,43	14,88	15,25	0,31823	2,09	0,79	-0,79
Vicos	19,82	20,34	21,04	20,40	0,61062	2,99	1,52	-1,52
H6	19,89	19,70	19,14	19,58	0,38691	1,98	0,96	-0,96
Moteado Beige	17,12	17,31	17,67	17,37	0,27827	1,60	0,69	-0,69
Comp. Blanco Sem	17,01	15,90	17,56	16,82	0,84704	5,04	2,10	-2,10
Andenes	16,89	17,07	16,89	16,95	0,10598	0,63	0,26	-0,26
Yunguyo	16,68	17,61	17,42	17,24	0,49044	2,84	1,22	-1,22
ALBUS	16,36	15,98	15,98	16,11	0,21462	1,33	0,53	-0,53

R = repetición, IC = Intervalo de confianza al 95%

Cuadro 17.12 Oligosacáridos de diez genotipos de lupino desamargado por Método fenol ácido sulfúrico

Lupino desamargado	Oligosacáridos (%) bs			Promedio (%)	Desv Estándar	Coef Var (%)	IC (+)	IC (-)
	R1	R2	R3					
AAHO	12,91	12,50	12,60	12,67	0,21085	1,66	0,52	-0,52
Altagracia	12,69	13,30	14,21	13,40	0,76404	5,70	1,90	-1,90
Cholo fuerte	8,89	8,89	8,59	8,79	0,17420	1,98	0,43	-0,43
Vicos	11,27	11,56	11,94	11,59	0,33426	2,88	0,83	-0,83
H6	11,34	11,23	10,93	11,17	0,21180	1,90	0,53	-0,53
Moteado Beige	9,81	9,91	10,11	9,95	0,15233	1,53	0,38	-0,38
Comp. Blanco Sem	9,76	9,15	10,06	9,65	0,46368	4,80	1,15	-1,15
Andenes	9,69	9,79	9,69	9,72	0,05801	0,60	0,14	-0,14
Yunguyo	9,58	10,09	9,99	9,88	0,26847	2,72	0,67	-0,67
ALBUS	9,40	9,20	9,20	9,27	0,11748	1,27	0,29	-0,29

R = repetición, IC = Intervalo de confianza al 95%

10. SECUENCIA DE CALCULOS DE CARBOHIDRATOS Y OLIGOSACÁRIDOS DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO DESAMARGADOS

Cuadro 17.13 Secuencia de cálculos para determinación de carbohidratos de diez genotipos de lupino desamargados

CALCULOS GLUCOSA	LUPINO DESAMARGADO									
	AAHO	ALT	CHF	VICOS	H6	MB	CBS	AND	YY	ALBUS
Absorbancia 490nm ¹	0,209	0,220	0,155	0,204	0,187	0,173	0,166	0,168	0,169	0,160
Glucosa (mg/mL) ²	2,55	2,70	1,75	2,48	2,23	2,01	1,92	1,95	1,96	1,83
FD (mg/6mL) ³	15,30	16,23	10,52	14,87	13,35	12,08	11,54	11,70	11,79	10,99
Glucosa (g/100 gm) bh	15,30	16,23	10,52	14,87	13,35	12,08	11,54	11,70	11,79	10,99
Humedad (%)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Glucosa (g/100 gm) bs	17,4	18,4	12,0	16,9	15,2	13,7	13,1	13,3	13,4	12,5
Grasa (%)	22,152	22,082	21,6	17,154	22,5	20,928	22,07	21,524	22,292	22,5
Glucosa (g/100 gm) bs	22,33	23,66	15,25	20,40	19,58	17,37	16,82	16,95	17,24	16,11

¹Absorbancias promedio (n=3); ²y= 0.0687x + 0.0342; ³FD multiplicado por 6 mL de extracto (no hubo dilucion); ⁴equivalencia 6mL de extracto por 100 mg de muestra. ⁵glucosa de muestra entera

Cuadro 17.14 Secuencia de cálculos para determinación de oligosacáridos de diez genotipos de lupino desamargados

CALCULOS OLIGOSACARIDOS	LUPINO DESAMARGADO									
	AAHO	ALT	CHF	VICOS	H6	MB	CBS	AND	YY	ALBUS
Absorbancia 490nm	0,209	0,220	0,155	0,204	0,187	0,173	0,166	0,168	0,169	0,160
Mn:Gal (mg/mL)	1,4	1,5	1,0	1,4	1,3	1,2	1,103	1,1	1,1	1,1
FD (mg/6mL)	8,68	9,19	6,07	8,45	7,62	6,92	6,62	6,71	6,76	6,32
Mn:Gal (g/100 gm) bh	8,68	9,19	6,07	8,45	7,62	6,92	6,62	6,71	6,76	6,32
Humedad (%)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mn:Gal (g/100 gm) bs	9,9	10,4	6,9	9,6	8,7	7,9	7,5	7,6	7,7	7,2
Grasa (%)	22,152	22,082	21,6	17,154	22,5	20,928	22,07	21,524	22,292	22,5
Mn:Gal (g/100 gm) bs	12,67	13,40	8,79	11,59	11,17	9,95	9,65	9,72	9,88	9,27

¹Absorbancias promedio (n=3); ²y= 0.1255x + 0.0278; ³FD multiplicado por 6 mL de extracto (no hubo dilucion); ⁴equivalencia 6mL de extracto por 100 mg de muestra. ⁵glucosa de muestra entera

CBS = Compuesto Blanco Semiprecoz
 ALT = Altigracia
 MB = Moteado Beige
 AND = Andenes
 VICOS = Vicos

H6 = H6
 CHF = Cholo Fuerte
 AAHO = AAHO
 YY = Yunguyo
 DU = Tarwi Dulce (L. albus)

11. DATA COMPARATIVA DE CARBOHIDRATOS Y OLIGOSACÁRIDOS DEL LUPINO POR DIFERENCIA Y COLORIMETRÍA

Cuadro 17.15 Resumen de azúcares de diez genotipos de lupino por lector de micropozos

Lupino	Lupino sin desamargar			L. desamargado		
	Carboh	Oligosac	Carb-Dif	Carboh	Oligosac	Carb-Dif
AAHO	30,3	19,11	32,0	22,3	12,7	30,0
Altagracia	25,4	16,51	37,1	23,7	13,4	29,2
Cholo fuerte	24,7	16,19	35,3	15,2	8,8	25,6
Vicos	41,0	24,24	36,2	20,4	11,6	33,6
H6	41,1	24,45	35,7	19,6	11,2	24,6
Moteado Beige	22,0	14,82	32,3	17,4	9,9	29,5
Comp. Blanco Sem	25,5	16,52	36,0	16,8	9,7	33,0
Andenes	38,7	23,21	31,7	16,9	9,7	33,9
Yunguyo	22,5	15,07	30,6	17,2	9,9	30,0
ALBUS	35,9	21,64	52,1	16,1	9,3	53,6
PROMEDIO (L. mutab)	30,1	18,9	34,1	18,8	10,8	29,9

**ANEXO 18. REGISTRO DE DATOS DE ALCALOIDES TOTALES DE DIEZ
GENOTIPOS DE LUPINO POR METODO PURPURA BROMOCRESOL**

**1. ABSORBANCIAS DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO POR METODO
PURPURA BROMOCRESOL**

Cuadro 18.1. Absorbancias de diez genotipos de lupino sin desamargar para
determinación de alcaloides por metodo Púrpura Bromocresol

Lupino inicial	Absorbancias 410 nm		Abs promedio	Desv Estándar	Coef Var (%)
	R1	R2			
AAHO	0.379	0.448	0.414	0.049	11.799
Altagracia	0.459	0.469	0.464	0.007	1.524
Cholo Fuerte	0.378	0.432	0.405	0.038	9.428
Vicos	0.459	0.480	0.470	0.015	3.163
H6	0.475	0.443	0.459	0.023	4.930
Moteado Beige	0.496	0.448	0.472	0.034	7.191
Compuesto Blanco S	0.501	0.496	0.499	0.004	0.709
Andenes	0.421	0.384	0.403	0.026	6.500
Yunguyo	0.523	0.480	0.502	0.030	6.063
Albus	0.160	0.137	0.149	0.016	10.952

Las Abs fueron de muestras sin diluir

Cuadro 18.2. Absorbancias de diez genotipos de lupino desamargados para determinación
de alcaloides por metodo Púrpura Bromocresol

Lupino desamargado	Absorbancias 410 nm		Abs promedio	Desv Estándar	Coef Var (%)
	R1	R2			
AAHO	0.005	0.013	0.009	0.006	62.854
Altagracia	0.009	0.014	0.012	0.004	30.744
Cholo Fuerte	0.005	0.029	0.017	0.017	99.827
Vicos	0.018	0.011	0.015	0.005	34.136
H6	0.008	0.020	0.014	0.008	60.609
Moteado Beige	0.014	0.030	0.022	0.011	51.426
Compuesto Blanco S	0.026	0.023	0.025	0.002	8.658
Andenes	0.014	0.004	0.009	0.007	78.567
Yunguyo	0.011	0.026	0.019	0.011	57.333
Albus	0.001	0.012	0.007	0.008	119.664

Las Abs fueron de muestras sin diluir

2. ALCALOIDES TOTALES DE DIEZ GENOTIPOS DE LUPINO POR METODO PÚRPURA BROMOCRESOL

Cuadro 18.3. Alcaloides de diez genotipos de lupino amargo por método Púrpura Bromocresol

Lupino amargo	Alcaloides Totales (%)		Alcaloides promedio	Desv Estándar	Coef Var (%)
	R1	R2			
AAHO	2.2537	2.6640	2.4588	0.290	11.799
Altagracia	2.7294	2.7888	2.7591	0.042	1.524
Cholo Fuerte	2.2477	2.5688	2.4083	0.227	9.428
Vicos	2.7294	2.8543	2.7918	0.088	3.163
H6	2.8245	2.6342	2.7294	0.135	4.930
Moteado Beige	2.9494	2.6640	2.8067	0.202	7.191
Compuesto Blanco S	2.9791	2.9494	2.9643	0.021	0.709
Andenes	2.5034	2.2834	2.3934	0.156	6.500
Yunguyo	3.1099	2.8543	2.9821	0.181	6.063
Albus	0.9514	0.8147	0.8830	0.097	10.952
Promedio (<i>L. mutabilis</i>)	2.8642	2.6957	2.7799		

R = repeticiones

Cuadro 18.4. Alcaloides de diez genotipos de lupino desamargados por método Púrpura Bromocresol

Lupino desamargado	Alcaloides Totales (%)		Alcaloides promedio	Desv Estándar	Coef Var (%)
	R1	R2			
AAHO	0.0297	0.0773	0.0535	0.034	62.854
Altagracia	0.0535	0.0832	0.0684	0.021	30.744
Cholo Fuerte	0.0297	0.1724	0.1011	0.101	99.827
Vicos	0.1070	0.0654	0.0862	0.029	34.136
H6	0.0476	0.1189	0.0832	0.050	60.609
Moteado Beige	0.0832	0.1784	0.1308	0.067	51.426
Compuesto Blanco S	0.1546	0.1368	0.1457	0.013	8.658
Andenes	0.0832	0.0238	0.0535	0.042	78.567
Yunguyo	0.0654	0.1546	0.1100	0.063	57.333
Albus	0.0059	0.0714	0.0387	0.046	119.664
Promedio (<i>L. mutabilis</i>)	0.1011	0.1051	0.1031		

R = repeticiones

3. SECUENCIA DE CÁLCULOS DE ALCALOIDES TOTALES

Data

Factor calibración	0.422
Vol Total extracto (mL)	12.5
Alicuota (mL)	0.5
Peso molecular Lupanin (mg)	248
Peso de la muestra (mg)	50

Cuadro 18.5. Data de alcaloides totales de diez genotipos de lupino amargo

Calculos	AAHO	ALT	CHF	VI	H6	MB	CBS	AND	YY	ALBUS
Absorbancia 410 nm ¹	0.414	0.464	0.405	0.470	0.459	0.472	0.499	0.403	0.502	0.149
Alcaloides Totales (%) bh	2.16	2.43	2.12	2.46	2.40	2.47	2.61	2.11	2.62	0.78
Humedad (%)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Alcaloides Totales (%) bs	2.46	2.76	2.41	2.79	2.73	2.81	2.96	2.39	2.98	0.88

¹Absorbancia de 2 repeticiones

Cuadro 18.6 Data de alcaloides totales de diez genotipos de lupino desamargados

Calculos	AAHO	ALT	CHF	VI	H6	MB	CBS	AND	YY	ALBUS
Absorbancia 410 nm	0.009	0.012	0.017	0.015	0.014	0.022	0.025	0.009	0.019	0.007
Alcaloides Totales (%) bh	0.05	0.06	0.09	0.08	0.07	0.12	0.13	0.05	0.10	0.03
Humedad (%)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Alcaloides Totales (%) bs	0.05	0.07	0.10	0.09	0.08	0.13	0.15	0.05	0.11	0.04

¹Absorbancia de 2 repeticiones

CBS = Compuesto Blanco Semiprecoz

ALT = Altagracia

MB = Moteado Beige

AND = Andenes

VI = Vicos

H6 = H6

CHF = Cholo Fuerte

AAHO = AAHO

YY = Yunguyo

DU = Tarwi Dulce (*L. albus*)

2. DATA COMPARATIVA DE ALCALOIDES TOTALES DE LUPINO POR TITULACIÓN Y ESPECTROFOTOMETRÍA

Cuadro 18.7 Comparación de alcaloides totales determinados por dos métodos

Lupino	Titulacion	Espectro UV 410	
	L. Inicial (%)	Lupino Inicial (%)	Lupino Desamargado (%)
AAHO	0.52	2.46	0.05
Altagracia	0.29	2.76	0.07
Cholo Fuerte	0.50	2.41	0.10
Vicos	1.44	2.79	0.09
H6	1.05	2.73	0.08
Moteado Beige	2.53	2.81	0.13
Compuesto Blanco S	2.60	2.96	0.15
Andenes	2.60	2.39	0.05
Yunguyo	0.99	2.98	0.11
Albus	0.87	0.88	0.04
PROMEDIO	1.39	2.70	0.09