

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**



**“COMPONENTES DE VALOR FUNCIONAL Y PROTEICO ANTES Y  
DESPUÉS DE LA EXTRUSIÓN Y SECADO EN TARWI  
(*Lupinus mutabilis* Sweet) DESAMARGADO”**

**Presentada por:**

**JAVIER SAÚL CÓRDOVA RAMOS**

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

**Lima - Perú**

**2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

**“COMPONENTES DE VALOR FUNCIONAL Y PROTEICO ANTES Y  
DESPUÉS DE LA EXTRUSIÓN Y SECADO EN TARWI  
(*Lupinus mutabilis* Sweet) DESAMARGADO”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR**

*Doctoris Philosophiae*

**Presentada por:**

**JAVIER SAÚL CÓRDOVA RAMOS**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Ph.D. Carlos Vílchez Perales  
**PRESIDENTE**

Ph.D. Patricia Glorio Paulet  
**ASESORA**

Ph.D. Alyssa Mariel Hidalgo Vidal  
**CO-ASESORA**

Ph.D. Ritva Repo de Carrasco  
**MIEMBRO**

Dr. Félix Camarena Mayta  
**MIEMBRO**

Ph.D. Andrea Brandolini  
**MIEMBRO EXTERNO**

*A Dios por brindarme la oportunidad; y a todos mis seres queridos por brindarme el apoyo y valor para culminar esta meta.*

## **AGRADECIMIENTO**

- Al Ministerio de Educación del Perú – MINEDU, Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica - CONCYTEC y al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación - FONDECYT, por brindarme el apoyo a través de una beca (CONV-000179-2015-FONDECYT-DE) para realizar y culminar satisfactoriamente mis estudios doctorales
- A mi Co-asesora de tesis doctoral y maestra ilustre Ph.D. Alyssa Hidalgo (Italia), y asesora, por sus valiosos consejos y guía durante la ejecución de la tesis doctoral.
- Al Proyecto, según Contrato 022 -2015-P.N.I.A. (Programa Nacional de Innovación Agraria), titulado: “Investigación biotecnológica de la cadena productiva del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) mediante la innovación fitotecnia de 30 ecotipos, procesamiento integral del grano y validación de métodos de análisis cualitativo y cuantitativo de alcaloides y proteínas”.

# ÍNDICE GENERAL

Pág.

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Lupino ( <i>L. mutabilis</i> Sweet).....	4
2.2 Composición nutricional del lupino .....	4
2.3 Calidad de las proteínas.....	5
2.3.1 Digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas.....	6
2.4 Compuestos bioactivos.....	7
2.4.1 Fenoles totales.....	7
2.4.2 Antioxidantes.....	9
2.4.3 Tocoferoles.....	11
2.4.4 Carotenoides.....	12
2.5 Procesamiento tecnológico del lupino.....	14
2.5.1 Desamargado.....	14
2.5.2 Extrusión.....	15
2.5.3 Secado por aspersión.....	16
2.6 Indicadores de daño térmico.....	18
2.6.1 Furosina.....	18
2.6.2 Hidroximetifurfural (HMF) .....	19
2.6.3 Glucosilisomaltol (GLI) .....	21
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 Lugar de ejecución.....	24
3.2 Material orgánico.....	24
3.3 Reactivos y materiales.....	24
3.4 Equipos.....	24
3.5 Procesamiento de los granos del lupino.....	25
3.5.1 Desamargado.....	25
3.5.2 Molienda.....	25
3.5.3 Extrusión.....	25
3.5.4 Secado por aspersión.....	26

3.6 Métodos de análisis.....	26
3.6.1 Determinación de la composición química proximal .....	26
3.6.2 Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas.....	26
3.6.3 Determinación del color.....	27
3.6.4 Determinación de la actividad de agua ( $a_w$ ) .....	27
3.6.5 Determinación de los azúcares.....	27
3.6.6 Determinación de los índices de daño térmico.....	28
a. Furosina.....	28
b. Hidroximetilfurfural y glucosilisomaltol .....	29
3.6.7 Determinación de la capacidad antioxidante.....	30
a. Método DPPH.....	30
b. Método ABTS <sup>+</sup> .....	30
3.6.8 Determinación del contenido fenólico total (TPC).....	31
3.6.9 Determinación de los tocoferoles.....	32
3.6.10 Determinación de los carotenoides.....	33
3.7 Diseño experimental.....	34
3.8 Análisis estadístico.....	34
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
4.1 Efecto de los procesos de desamargado, extrusión y secado por aspersión en la digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas, la composición química proximal y el daño térmico.....	37
4.1.1 Análisis de varianza para los procesos y genotipos.....	37
4.1.2 Efecto del proceso en la digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas y la composición química proximal.....	39
a. Desamargado de los granos lupino.....	39
b. Extrusión de la harina desamargada.....	41
c. Secado por aspersión de la bebida de lupino.....	43
4.1.3 Efecto del proceso en los marcadores de daño térmico.....	44
a. Color y actividad de agua.....	44
b. Furosina, HMF y GLI.....	46
4.2 Efecto de los procesos de desamargado, extrusión y secado por aspersión en la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos totales.....	47
4.3 Efecto de los procesos de desamargado, extrusión y secado por aspersión en los tocoferoles y carotenoides.....	54

4.3.1 Efecto del proceso en los tocoferoles.....	54
4.3.2 Efecto del proceso en los carotenoides.....	56
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Media del cuadrado del análisis de la varianza para todos los tratamientos.....	38
Tabla 2. Media ( $\pm$ desviación estándar) de la digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas (%) y composición química proximal (g/100 g de MS) de harinas crudas y procesadas de tres genotipos de lupinos andinos.....	40
Tabla 3. Media ( $\pm$ desviación estándar) del contenido de azúcares (fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa, g/100 g de MS) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	41
Tabla 4. Media ( $\pm$ desviación estándar) de las coordenadas de color ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ ), diferencia de color ( $\Delta E$ ) y de la actividad de agua ( $a_w$ ) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	45
Tabla 5. Media ( $\pm$ desviación estándar) de los índices de daño térmico (furosina, mg/100 g de proteína; hidroximetilfurfural, HMF, mg/kg MS; y glucosilisomaltol, GLI, mg/kg MS) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	47
Tabla 6. Media ( $\pm$ desviación estándar) de la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS+) y del contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	48
Tabla 7. Porcentaje (%) de reducción del promedio de la capacidad antioxidante y del contenido de fenoles totales (TPC) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	54

Tabla 8. Media ( $\pm$ desviación estándar) del contenido de tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -tocoferol, $\gamma$ -tocoferol y $\delta$ -tocoferol, mg/kg MS) y carotenoides (luteína y zeaxantina, mg/kg MS) de las harinas de tres genotipos de lupino Andino.....	56
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema experimental general de la investigación.....	36
Figura 2. Promedio de la capacidad antioxidante por DPPH y ABTS <sup>+</sup> de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	52
Figura 3. Promedio de los compuestos fenólicos totales (TPC) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	53

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Variación total (%) explicada por el tratamiento, el genotipo, su interacción y el error.....	78
Anexo 2. Composición química proximal (g/100 g de MS) y digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas (%) de harinas crudas y procesadas de tres genotipos de lupinos andinos.....	79
Anexo 3. Contenido de azúcar (fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa, g/100 g de MS) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	80
Anexo 4. Coordenadas de color ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ ), la diferencia de color ( $\Delta E$ ) y la actividad del agua ( $a_w$ ) de las harinas de tres genotipos de lupino andino...	81
Anexo 5. Índices de daño térmico (furosina, mg/100 g de proteína; hidroximetilfurfural, HMF, mg/kg MS; y glucosilisomaltol, GLI, mg/kg MS) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.....	82
Anexo 6. Capacidad antioxidante (DPPH y ABTS <sup>+</sup> ) y del contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) de las harinas de tres genotipos de lupino andino...	83
Anexo 7. Contenido de tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -tocoferol, $\gamma$ -tocoferol y $\delta$ -tocoferol, mg/kg MS) y carotenoides (luteína y zeaxantina, mg/kg MS) de las harinas de tres genotipos de lupino Andino.....	84
Anexo 8. Granos de lupino o tarwi ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet). .....	85
Anexo 9. Granos de lupino desamargado de diferentes variedades.....	86
Anexo 10. Preparación de la bebida a partir de los granos de lupino desamargado.....	87

Anexo 11. Bebida de lupino.....	88
Anexo 12. Secado por aspersion de la bebida de lupino.....	89
Anexo 13. Muestras de lupino amargo, desamargado, extruido y secado por aspersion.....	90
Anexo 14. Extracto de las muestras de lupino amargo, desamargado, extruido y secado por aspersion.....	91
Anexo 15. Analisis de los componentes funcionales en los laboratorios de la Universidad de Milán – Italia.....	92
Anexo 16. Artículo publicado en Cereal Chemistry – Wiley/Indexado en WOS y Scopus.....	93
Anexo 17. Artículo publicado en Scientia Agropecuaria/Indexado en WOS y Scopus.....	94

## RESUMEN

Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) tiene beneficios para la salud con posibilidades prometedoras para la industria alimentaria. El objetivo general fue estudiar el efecto del desamargado, extrusión y secado por aspersion en los componentes nutricionales y funcionales del tarwi (*L. mutabilis*). Tres genotipos (Altagracia, Andenes y Yunguyo) fueron procesados bajo los siguientes tratamientos: desamargado (en agua); extrusión (después del desamargado); y secado por aspersion con maltodextrina y goma arábica (después del desamargado seguido de molienda húmeda y filtración de sólidos gruesos). El tratamiento de procesamiento presentó un efecto predominante sobre todos los componentes nutricionales y funcionales mientras que el genotipo mostró un efecto limitado. Las proteínas y los lípidos (47.4 y 16.2 g/100 g MS) del lupino amargo (control) se modificaron por el procesamiento. Los extruidos tuvieron un mayor contenido de proteína (55.7 g/100 g) y digestibilidad (68.1%), con bajo daño térmico (8.7 mg de furosina/100 g de proteína), que los lupinos desamargados. Se encontró daño térmico en las muestras secadas con adición de maltodextrina (54.1±20.7 mg de furosina/100 g de proteína; 0.60 mg de hidroximetilfurfural/kg; 0.58 mg de glucosilisomaltol/kg), y una alta digestibilidad (72.8-74.0%). El procesamiento mejoró la digestibilidad, sin inducir daños térmicos relevantes. El secado por aspersion afectó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) a los compuestos fenólicos totales (TPC) y su actividad antioxidante, disminuyéndolos en contenido. Los lípidos influyeron negativamente en la cuantificación de TPC; por esta razón, las muestras desengrasadas tuvieron más alto TPC y capacidad antioxidante que las muestras sin desengrasar. En todas las muestras de lupino sin procesar y procesado se encontraron  $\gamma$ -tocoferol en abundancia, luteína en cantidades pequeñas, y trazas de zeaxantina. El desamargado y la extrusión no afectaron significativamente ( $p \geq 0.05$ ) los contenidos de los tocoferoles y carotenoides. El tarwi (lupino Andino) contiene nutrientes y compuestos bioactivos importantes para la nutrición y la salud humana.

**Palabras clave:** Bebida de lupino; extrusión; daño térmico; *Lupinus mutabilis*; secado por aspersion.

## ABSTRACT

Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) had health benefits with promising possibilities for the food industry. The general objective was to study the effect of debittering, extrusion and spray drying on the nutritional and functional components of tarwi (*L. mutabilis*). Three genotypes (Altagracia, Andenes and Yunguyo) were processed under the following treatments: debittering (water); extrusion (after debittering); and spray drying with maltodextrin and gum arabic (after debittering followed by wet-grinding and filtering of coarse solids). Processing treatment showed a predominant effect on all nutritional and functional components while the genotype showed a limited effect. The proteins and lipids (47.4 and 16.2 g/100 g MS) of bitter lupin (control) were modified by processing. The extrudates had higher protein content (55.7 g/100 g) and digestibility (68.1%), with low heat damage (8.7 mg of furosin/100 g of protein), than the debittered lupins. Thermal damage was found in dried samples with addition of maltodextrin (54.1±20.7 mg of furosin/100 g of protein; 0.60 mg of hydroxymethylfurfural/kg; 0.58 mg of glucosylisomaltol/kg), and a high digestibility (72.8 - 74.0%). Processing improved digestibility without inducing relevant heat damage. Spray drying significantly affected ( $p \leq 0.05$ ) the total phenolic compounds (TPC) and their antioxidant activity, reducing their content. Lipids negatively influenced TPC quantification; for this reason, the defatted samples had higher TPC and antioxidant capacity than the non-defatted samples. In all samples of unprocessed and processed lupin, were found  $\gamma$ -tocopherol in abundance, lutein in small quantities, and zeaxanthin in traces. Debittering and extrusion did not significantly affect ( $p \geq 0.05$ ) the contents of tocopherols and carotenoids. The tarwi (Andean lupin) contains nutrients and bioactive compounds important for nutrition and human health.

**Keywords:** Lupin drink; extrusion; heat damage; *Lupinus mutabilis*; spray drying.

## I. INTRODUCCIÓN

El lupino Andino (*Lupinus mutabilis* Sweet), es una leguminosa y una de las cuatro especies del género *Lupinus* cultivados en el mundo (*Lupinus albus*, *Lupinus luteus* y *Lupinus angustifolius*). Las cuatro especies de lupino son ricas en proteínas y lípidos (ricos en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados) (Bähr *et al.* 2014; Carvajal-Larenas *et al.* 2016). *L. mutabilis* es una fuente prometedora de nutrientes (Carvajal-Larenas *et al.* 2016; Hickisch *et al.* 2016; Caligari *et al.* 2000; Gross *et al.* 1988), y tiene el mayor contenido de proteínas y lípidos (32-53% y 13-25%, respectivamente) entre las especies de lupinos cultivadas (Carvajal-Larenas *et al.* 2016). Los estudios nutricionales muestran que los lupinos se pueden comparar con la soya por su contenido nutricional (Kaczmarska *et al.* 2018); además, pueden ser empleados en el enriquecimiento de la harina de trigo para mejorar el equilibrio de aminoácidos y aumentar el contenido de proteínas de muchos productos, tal como en la panadería y en la preparación de alimentos funcionales y dietéticos (Villarino *et al.* 2015; Güemes-Vera *et al.* 2004).

El lupino Andino contiene muchos compuestos bioactivos que son importantes para la salud (Berghout *et al.* 2015), tales como: los compuestos fenólicos, tocoferoles y carotenoides (Ranilla *et al.* 2009; Czubinski *et al.* 2019); además estos compuestos bioactivos presentan una alta actividad antioxidante dependiendo de la variedad y genotipo. Los compuestos fenólicos son los más abundantes metabolitos secundarios presentes en las leguminosas (Dueñas *et al.* 2009), como el lupino; además estos compuestos fenólicos se consideran como antioxidantes naturales, que pueden prevenir el desarrollo de muchas enfermedades, como arteriosclerosis, cáncer, y otros (Arnoldi *et al.* 2015).

El mayor efecto terapéutico de los compuestos fenólicos, debido a la actividad antioxidante, depende de su estructura química, incluyendo el número de grupos hidroxilo y su posición. Los antioxidantes son capaces de frenar la oxidación de otras moléculas importantes para el organismo (Oomah *et al.* 2006). La capacidad antioxidante producida por la presencia de los polifenoles puede contrarrestar los radicales libres minimizando el daño celular del

organismo (Lammi *et al.* 2016; Guerreo-Ochoa *et al.* 2015). Los tocoferoles presentan una potente actividad antioxidante y tiene muchos beneficios para la salud humana, como actividad anticancerígena (Saini y Keum 2016). Los carotenoides también presentan actividad antioxidante. El consumo de carotenoides a través de nuestra dieta alimenticia puede reducir el riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares gracias a su poder antioxidante (Kourouma *et al.* 2019). El interés comercial por el lupino Andino procesado se está incrementando; por consiguiente, existe la necesidad de investigar que ocurre con los compuestos bioactivos durante su procesamiento.

Todos los lupinos contienen factores antinutricionales, principalmente alcaloides amargos, más altos en *L. mutabilis* (28.0 g/kg) y más bajos en *L. albus* (1.8 g/kg; Carvajal-Larenas *et al.* 2016), cuyo contenido debe reducirse seleccionando especies de bajo contenido de alcaloides o adoptando procesos de desamargado, como hervir y remojar en agua corriente (Musco *et al.* 2017). La extrusión mejora las propiedades de la fibra de las capas de semillas de lupino, e inactiva muchas enzimas alimentarias (Zhong *et al.* 2019). El secado por aspersión o también llamado atomización, es otro proceso tecnológico que mejora el valor nutricional, la solubilidad y la estabilidad del alimento, y reduce la degradación de los compuestos bioactivos (Sosnik y Seremeta 2015).

El proceso tecnológico (desamargado, extrusión y secado por aspersión) modifica muchas características químicas, físicas, enzimáticas y digestibilidad de las legumbres. Estos procesos mejoran el valor nutricional (Palanisamy *et al.* 2018), y al mismo tiempo podrían generar compuestos tóxicos producto de un daño térmico (hidroximetilfurfural, furosina) (Islam *et al.* 2014). En tal sentido, es necesario estudiar el efecto del proceso tecnológico durante la elaboración de los alimentos, con fines de obtener productos de alto valor nutricional y sin presencia de compuestos tóxicos. Por lo tanto, el objetivo general de esta investigación fue estudiar el efecto del desamargado, extrusión y secado por aspersión en los componentes nutricionales y funcionales del tarwi (*L. mutabilis*). Los objetivos específicos de la investigación fueron: (1) evaluar el efecto del proceso de desamargado, extrusión y secado por aspersión sobre la composición química proximal, la digestibilidad *in vitro* de las proteínas y los marcadores de daño por calor, en tres genotipos (Altagracia, Andenes y Yunguyo) del tarwi; (2) estudiar el efecto del proceso de desamargado, extrusión y secado por aspersión sobre los componentes fenólicos totales y su capacidad antioxidante, en tres genotipos (Altagracia, Andenes y Yunguyo) del tarwi; y (3) determinar el efecto del proceso

de desamargado, extrusión y secado por aspersión sobre los tocoferoles y carotenoides, en tres genotipos (Altagracia, Andenes y Yunguyo) del tarwi.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 LUPINO (*L. mutabilis*)

El lupino (*L. mutabilis*), es una leguminosa de la región andina de Sudamérica, ampliamente utilizada por la población como alimento, de forma tradicional (Camarena *et al.* 2012). En Perú también es llamado Chocho por el norte o Tarwi por el sur y centro (Miano *et al.* 2015; Camarena *et al.* 2012; Neves 1993) y su hábitat es en zonas elevadas. Esta leguminosa presenta alto contenido de proteínas y lípidos (Carvajal-Larenas *et al.* 2014; Carvajal-Larenas *et al.* 2016).

Existen muchos genotipos de *L. mutabilis*, en diversas partes del Perú, de los cuales los más conocidos son: AAHO (La Libertad); Altagracia, Cholo Fuerte y Vicos (Ancash); H6, Moteado Beige y Compuesto Blanco Semiprecoz (Junín); Andenes (Cuzco); Yunguyo (Puno) (Camarena *et al.* 2012; Neves 1993). Gross *et al.* (1988) indican que las especies: *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, son originarios de Europa, en cambio el *L. mutabilis* es originario de América. Según Planchuelo (1999) los lupinos pueden ser agrupados como “Lupino dulce” y “Lupino amargo”.

### 2.2 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL LUPINO

El *L. mutabilis* se utiliza principalmente como fuente de proteínas en la nutrición humana y animal en diversas partes del mundo, y su consumo ha aumentado en los últimos años (Güemes-Vera *et al.* 2004). Esta legumbre se está considerando como un cultivo prometedor para la mayoría de los países, y especialmente en Perú, donde su producción está creciendo desde que comenzó a ser incentivada por su composición nutricional que presenta el lupino (Miano *et al.* 2015).

El *L. mutabilis* presenta 38.85 g/100 g b.h. (base húmeda), de proteínas, según Marrou *et al.* (2011); según Carbajal-Larena *et al.* (2013) presenta un contenido proteico de 41.4 g/100 g b.s. (base seca). Los aminoácidos en promedio que se encuentran en el lupino son: alanina (3.3 g/100 g proteínas), arginina (10.2 g/100 g proteínas), ácido aspártico (9.6 g/100 g

proteínas), ácido glutámico (24.3 g/100 g proteínas), glicina (3.8 g/100 g proteínas), isoleucina (4.2 g/100 g proteínas), leucina (7.0 g/100 g proteínas), lisina (5.8 g/100 g proteínas), fenilalanina (3.5 g/100 g proteínas), prolina (3.8 g/100 g proteínas), serina (4.9 g/100 g proteínas), treonina (3.5 g/100 g proteínas), histidina (3.5 g/100 g proteínas), triptófano (0.8 g/100 g proteínas), tirosina (4.0 g/100 g proteínas), valina (3.8 g/100 g proteínas), cistina (1.6 g/100 g proteínas) y metionina (0.8 g/100 g proteínas). En general, el contenido de aminoácidos en lupino amargo y desamargado no difiere mucho. Por otro lado, entre especies de lupinos existen pequeñas diferencias en cuanto al contenido de aminoácidos esenciales (Carvajal-Larenas *et al.* 2016).

En cuanto a los demás nutrientes, Marrou *et al.* (2011) indican que el lupino (*L. mutabilis*) presenta: humedad (18.72 g/100 g), extracto etéreo (21.86 g/100 g), fibra cruda (6.18 g/100 g), carbohidratos (10.11 g/100 g), cenizas (4.28 g/100 g). Además, presenta los siguientes minerales: potasio (153.46 mg/100 g), fósforo (344.67 mg/100 g), hierro (1.08 mg/100 g), sodio (55.86 mg/100 g), calcio (72.85 mg/100 g). Asimismo, el lupino contiene algunas vitaminas como: vitamina B1 (0.47 mg/100 g), Vitamina B2 (0.24 mg/100 g), Vitamina B3 (1.17 mg/100 g). Por otro lado, la composición nutricional de las semillas de lupino, variedad “Inti”, con bajos niveles de alcaloides cultivadas en el sur de Chile son 51, 16 y 14.7% de proteínas, lípidos y oligosacáridos, respectivamente. La calidad de las proteínas de esta variedad no es tan buena debido a los niveles bajos de aminoácidos de azufre que se encuentra en sus proteínas. En cuanto a los ácidos grasos, este lupino presenta: C16:0, 13.9%; C18:0, 3.0%; C18:1, 41.8%; C18:2, 38.9%; y C18:3, 2.6% de ácidos grasos totales. Además, los oligosacáridos son: rafinosa (2.49%); estaquiosa (10.1%), verbascosa (0.85%) (Gross *et al.* 1988).

### **2.3 CALIDAD DE LAS PROTEÍNAS**

La calidad de la proteína de los alimentos depende de muchos factores, por ejemplo, el contenido de aminoácidos esenciales, biodisponibilidad de aminoácidos esenciales y digestibilidad de las proteínas. Las proteínas del huevo y de la leche son generalmente consideradas como las mejores proteínas de calidad; por esta razón, la calidad de proteínas de otras fuentes alimenticias puede ser determinada por una simple comparación entre las proteínas del alimento a evaluar y las proteínas del huevo o de la leche (Pires *et al.* 2006; Hur *et al.* 2011; Almeida *et al.* 2015).

La calidad de las proteínas se evalúa a través de ensayos de digestibilidad *in vitro*, midiendo EAA (aminoácidos esenciales), AAS (score de aminoácidos) y PDCAAS (score de aminoácidos corregido por la digestibilidad de la proteína) (Almeida *et al.* 2015). Los ensayos EAA y AAS no consideran si realmente la proteína es digerible o no es fácilmente digerible (Mokrane *et al.* 2010). En cambio, el *score* de aminoácidos corregido por la digestibilidad de la proteína (PDCAAS) es un método que toma en cuenta los ensayos de AAS y digestibilidad de la proteína del alimento para determinar la calidad de la proteína. La digestibilidad de proteínas es un indicador muy potente para estimar la disponibilidad de proteínas para la absorción intestinal después de la digestión (Hur *et al.* 2011). En términos generales, la calidad de las proteínas del lupino se ve afectada por la deficiencia de metionina y triptófano. Mayormente, la calidad aminoacídica se mejora mezclando harinas de diferentes alimentos; como, por ejemplo una mezcla de cereales y leguminosas: quinua, kiwicha, lupino y soya (Borquez 2008; Carvajal-Larenas *et al.* 2016).

### **2.3.1 Digestibilidad *in vitro* de las proteínas**

El análisis de la digestibilidad *in vitro* de proteínas es un método muy utilizado para determinar el parámetro de digestibilidad de los alimentos. Este análisis simula, mediante enzimas proteolíticas (ejemplo: pepsina, pancreatina, papaína), los procesos digestivos que ocurren en el tracto gastrointestinal humano (Hur *et al.* 2011).

La utilización biológica de una proteína depende principalmente de su digestibilidad por las peptidasas gástricas, pancreáticas e intestinales; su composición, particularmente con respecto a los aminoácidos esenciales; y la absorción o transporte de aminoácidos di- tri- péptidos en la sangre. Los métodos *in vitro* desempeñan un papel importante en el análisis de la digestibilidad de las proteínas, y pueden utilizarse comercialmente para monitorear la calidad de las proteínas (Glencross *et al.* 2010).

Las modificaciones que afectan comúnmente a la digestibilidad de proteínas incluyen proteólisis, desdoblamiento térmico, agregación, reacciones de carbonil-amina, entre otros. La estructura de muchas proteínas se desestabiliza por las condiciones ácidas del estómago, que ayuda a su hidrólisis y desestabilización adicional por pepsina (Burel *et al.* 2000). Almeida *et al.* (2015) reportó que el aislado de soya tiene 55.2% y del de caseína un 83.7%

de digestibilidad *in vitro*. Asimismo, el haba cruda y el frijol crudo presentan 70.8 y 68.1% de digestibilidad de proteínas *in vitro*, respectivamente (Alonso *et al.* 2000).

El método de digestibilidad *in vitro* de proteínas consiste en medir el porcentaje de proteínas que se hidrolizan por las enzimas proteolíticas. Este método es más rápido, más asequible e igualmente efectivo que los métodos *in vivo* (Pires *et al.* 2006). Según Almeida *et al.* (2015) la digestibilidad *in vitro* se calcula mediante la ecuación:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = [(N_s - N_b)/N_s] \times 100$$

Dónde:  $N_s$  y  $N_b$ , representan el contenido de nitrógeno en la muestra y en el blanco, respectivamente.

## **2.4 COMPUESTOS BIOACTIVOS**

### **2.4.1 Fenoles totales**

Uno de los grupos más abundantes de metabolitos secundarios en las leguminosas son los compuestos fenólicos (Dueñas *et al.* 2009), antioxidantes naturales que pueden prevenir el desarrollo de muchas enfermedades como aterosclerosis, cáncer, y otros. Los diferentes compuestos fenólicos encontrados en las semillas de lupino pueden influir en el sabor y el color (Dueñas *et al.* 2012) y también pueden actuar como fungicidas, y bacteriostáticos. Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo (Siger *et al.* 2012). A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente (Erbaş *et al.* 2005).

No se conocen bien los factores que disparan la producción de metabolitos secundarios (Dueñas *et al.* 2012). Al faltar C, N o P, se altera la producción de metabolitos primarios y se originan inductores de enzimas que darán lugar a metabolitos secundarios (Jiménez-Martínez *et al.* 2007). La biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés. Las células vegetales producen metabolitos secundarios importantes y muchos de estos productos secundarios tienen uso en la industria farmacéutica y en la producción de test de diagnóstico, de fragancias, de aditivos alimentarios y de biocidas en general (Paraskevopoulou *et al.* 2012).

En general, la composición principal de los compuestos fenólicos identificados en las diferentes especies de lupinos es: flavonas, ácidos fenólicos e isoflavonas. Por ejemplo, en *L. angustifolius* las flavonas, los ácidos fenólicos y las isoflavonas están presentes en 76%, 19% y 4% del total de fenoles identificados, respectivamente (Dueñas *et al.* 2009). Asimismo, muchas de las isoflavonas presentes en pequeñas cantidades en las diferentes especies de lupinos tienen más importancia que las flavonas, debido a su actividad fitoestrogénica no esteroidea (Ranilla *et al.* 2009). Además, al igual que las flavonas, son buenos antioxidantes.

Los compuestos fenólicos en el lupino se pueden encontrar en todas las partes de planta, como: tallo, hojas, raíces y semillas. Las concentraciones de los compuestos fenólicos varían en función a las partes de la planta. En el caso de *L. exaltatus* se observó que presenta un mayor contenido de isoflavonas en las raíces que en los tallos (García-López *et al.* 2006). Los compuestos fenólicos también varían en función a las especies, genotipos, ciclos de crecimiento de la planta, lugares de crecimiento y estaciones del año (Siger *et al.* 2012). Los cambios en el contenido fenólico durante el ciclo de crecimiento de la planta se deben a que en cada etapa tiene diferentes requisitos biológicos, enfrenta diversas condiciones ambientales y desarrollan varios mecanismos de defensa. El *L. albus*, presentó un mayor contenido de isoflavonas en plantas sembradas en otoño que en primavera (D'Agostina *et al.* 2008).

Se ha encontrado que el contenido total de extractos fenólicos (expresados en ácido gálico) y procianidina (expresados como (+)-catequina) en acetona acuosa (70% v/v) de diferentes especies de lupino (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. mutabilis* y *L. hispanicus*) varió entre 7 - 70 g/kg y 70 - 530 mg/kg semilla, respectivamente (Ricardo-da-Silva *et al.* 1993). Otro estudio muestra que los contenidos fenólicos totales de ocho genotipos de *L. angustifolius* variaron de 11.9 a 14.7 mg/g equivalente de catequina (Oomah *et al.* 2006).

Kalogeropoulos *et al.* (2010) estudiaron los compuestos fenólicos (expresados en ácido gálico equivalente) en legumbres secas cocidas, incluido el lupino blanco (*L. albus*) y encontraron: lupino (19.4 mg GAE/100 g de peso fresco), frijol con ojo negro (15.4 mg GAE/100 g de peso fresco), habas (19.5 mg GAE/100 g de peso fresco), garbanzos (20.5 mg GAE/100 g de peso fresco), lentejas (25.85 mg GAE/100 g de peso fresco), frijoles pintos (18.1 mg GAE/100 g de peso fresco), arvejas partidas (12.7 mg GAE/100 g de peso fresco),

frijol blanco (15.1 mg GAE/100 g de peso fresco). Asimismo, estos investigadores encontraron una disminución significativa en el contenido fenólico total durante el proceso de cocción (remojo y ebullición de las legumbres), debido a que algunos compuestos fenólicos son sensibles a las altas temperaturas. Por otro lado, la cuantificación total de los compuestos fenólicos se realiza mayormente a través de técnicas espectrofotométricas. Esta técnica demostró ser un medio potencial para la cuantificación de manera rápida y fácil (Martínez-Villaluenga *et al.* 2009).

#### **2.4.2 Antioxidantes**

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una molécula que pierde un electrón y por lo tanto se oxida a otra que gana el electrón y por lo tanto se reduce (Oomah *et al.* 2006). Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos (Ranilla *et al.* 2009).

Debido a esto es que los antioxidantes como los polifenoles son a menudo agentes reductores y ejercen funciones preventivas (neuroprotectoras) contra enfermedades tan importantes como las coronarias (Tsaliki *et al.* 1999). La actividad antioxidante producido por la presencia (estructura química) de los polifenoles. En general, los antioxidantes liberan los radicales libres del organismo, estos radicales son moléculas altamente reactivas que pueden dañar las células del organismo. Los antioxidantes contrarrestan los radicales libres minimizando el daño celular (Sbihi *et al.* 2013).

La protección contra la enfermedad de los compuestos fenólicos puede estar asociada con las poderosas propiedades antioxidantes y de barrido de radicales libres de estos compuestos (Guerreo-Ochoa *et al.* 2015). Esta propiedad afecta al sistema autoinmune del organismo consumidor. El contenido de fenólicos depende no sólo de la especie y variedad sino también del grado de madurez (Martínez-Villaluenga *et al.* 2009).

Los fenoles como flavonas e isoflavonas también están presentes en varias partes del lupino (Ranilla *et al.* 2009), además los lupinos presentan una alta actividad antioxidante. El mayor efecto terapéutico de los compuestos fenólicos, como la actividad antioxidante, depende de

su estructura, incluyendo el número de grupos hidroxilo y su posición. En general, los compuestos flavonoides presentan una actividad antioxidante más fuerte que los no flavonoides (Oomah *et al.* 2006).

La actividad antioxidante del lupino es similar (Martínez-Villaluenga *et al.* 2009) o en algunos casos inferior (Wang *et al.* 2008) en comparación con otras leguminosas. Los lupinos contienen compuestos fenólicos (taninos y flavonoides) (Oomah *et al.* 2006). Existe cierta correlación positiva entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de los lupinos (Siger *et al.* 2012); pero Rumiya *et al.* (2013) mencionaron que no hay una asociación específica entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante en el lupino debido a que otros compuestos como los carotenoides y tocoferoles, también presentes en el lupino, pueden contribuir a la actividad antioxidante. En tal sentido, las condiciones del proceso de extracción de antioxidantes también juegan un papel importante en el poder antioxidante. Por ejemplo, según Tsaliki *et al.* (1999) el extracto de metanol caliente muestra una mayor actividad antioxidante que la del extracto frío. Por otro lado, las mediciones de las actividades antioxidantes se hacen por técnicas espectrofotométricas, tal como lo señaló Martínez-Villaluenga *et al.* (2009).

Martínez-Villaluenga *et al.* (2009) investigaron capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) y actividad de eliminación de radicales DPPH (DPPH-RSA) en diversos productos de lupino. En los productos elaborados (harinas) de muestras de *L. angustifolius* y *L. albus*, TEAC y DPPH-RSA disminuyeron (43% y 38%, respectivamente) en comparación a los granos crudos de lupino (control). La proteína aislada de *L. albus* presentó un TEAC más bajo (24%) y un nivel dos veces más alto de DPPH-RSA que las muestras de harinas de lupino tratadas. Los procedimientos tecnológicos, *α*-galactósido y aislamiento de proteínas, proporcionan productos con alto contenido proteico, pero con menor capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales que las semillas crudas, aunque los niveles de capacidad antioxidante de estos productos de lupino se parezcan a los de los cereales.

La capacidad antioxidante de las semillas crudas de lupino, medida por el ensayo TEAC, varió de 47 a 71  $\mu\text{mol}$  de trolox/g en base seca, mientras que la actividad antioxidante por eliminación de radicales DPPH varió de 2.83 – 3.09  $\mu\text{mol}$  de trolox/g en base seca (Martínez-Villaluenga *et al.* 2009). Sin embargo, las semillas crudas de frijol y soya tienen valores más bajos de TEAC (Fernández-Orozco *et al.* 2008).

Lampart-Szczapa *et al.* (2003) examinaron las propiedades antioxidantes de harinas y cascara de lupino en extractos de etanol. El contenido de taninos (los antioxidantes naturales de lupino) de las harinas fue varias veces mayor que en las cascara. Se encontró actividad antioxidante tanto en las harinas como en las cascara del lupino. Asimismo, estos investigadores probaron como influye la irradiación sobre los antioxidantes del lupino: las dosis crecientes de irradiación disminuyeron los efectos antioxidantes de los extractos de lupino; sin embargo, las actividades antioxidantes de algunas muestras fueron mayores.

### **2.4.3 Tocoferoles**

Los tocoferoles son conocidos también como tocoles. Estos compuestos, que tienen dentro de su estructura química un componente fenólico y una cadena apolar, presentan actividad biológica de vitamina E (Shahidi y Ambigaipalan 2015). Existen cuatro tipos de tocoferoles:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocoferol. Los tocoferoles presentan una potente actividad antioxidante y tiene muchos beneficios para la salud humana, como actividad anticancerígena (Saini y Keum 2016).

Los tocoferoles, comúnmente conocidos como vitamina E, son considerados como antioxidantes naturales, y son muy eficaces en la fase lipídica, debido a que inhiben la peroxidación lipídica. Los tocoferoles, al ser compuestos hidrófobos, juegan un papel importante en la protección contra los radicales libres que se producen en los procesos de oxidación. La determinación del contenido de tocoferol en los alimentos es de suma importancia para poder determinar la importancia biológica y su aplicación (Traber y Atkinson 2007).

Los tocoferoles son uno de los antioxidantes vegetales mejor examinados y más populares en la industria alimentaria, debido a sus diversas aplicaciones. Adicionalmente, todos los tipos de tocoferoles son presentes en las partes verdes de las plantas y en sus semillas, y actúan como los principales antioxidantes en las membranas celulares. Cada uno de estos tipos de tocoferoles tiene diferentes actividades biológicas y antioxidantes (Bramley *et al.* 2000; Kamal-Eldin y Appelqvist 1996).

Las diferentes especies de lupinos contienen principalmente tocoferoles del tipo:  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. La presencia del  $\beta$ -tocoferol aún no ha sido detectada en ninguna

variedad de lupino. La presencia y el contenido del tipo de tocoferol varían en función a las especies del lupino. El  $\gamma$ -tocoferol es el tocoferol más abundante y está casi siempre presente en todas las especies del lupino, mientras que  $\alpha$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol no se encuentran en todas las especies del lupino. En *L. angustifolius* no se encontró  $\delta$ -tocoferol; en *L. mutabilis* no se encontraron  $\alpha$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol (Boschin y Arnoldi 2011). Por otro lado, el aceite de las semillas de lupino contiene grandes cantidades de tocoferoles totales en comparación con otros aceites populares extraídos de semillas, como la alcachofa (Hassanein *et al.* 2011).

Frias *et al.* (2005), encontraron que las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol en la semilla cruda de *L. albus* fueron 0.19, 20.1 y 0.25 mg/100 g de materia seca, respectivamente. Además, estos investigadores observaron que después de un proceso de germinación de las semillas de *L. albus* las concentraciones de los tocoferoles cambiaron significativamente, mostrando un aumento de  $\alpha$ -tocoferol en 20 veces, y una fuerte disminución de  $\gamma$ -tocoferol. Por otro lado, según Kalogeropoulos *et al.* (2010) el proceso de cocción causa una pérdida significativa de tocoferoles; asimismo estos investigadores encontraron concentraciones bajas de  $\delta$ -tocoferol (0.02 mg/100 g de peso fresco) en semillas de *L. albus*.

Lampart-Szczapa *et al.* (2003) encontraron  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol en muestras de aceites de *L. luteus* (var. Juno) y *L. albus* (var. Wat), y sobre todo  $\gamma$ -tocoferol. En este estudio se pudo evidenciar una relación inversa entre el contenido de tocoferol y la cantidad de grasa presente en el lupino. El contenido de tocoferol en el aceite obtenido de la harina de *L. luteus* (var. Juno) fue aproximadamente un 30% mayor que en el *L. albus* (var. Wat). Asimismo, en ambos lupinos, como en otras plantas oleaginosas, existe una mayor presencia de  $\gamma$ -tocoferol; además, se encontró más  $\gamma$ -tocoferol (88.5%) en el *L. luteus* que en el *L. albus* (86.1%). Además, el contenido de tocoferol presente en el lupino es similar al de la soja, pero menor que el girasol y aceite de colza.

#### **2.4.4 Carotenoides**

Los carotenoides son pigmentos naturales que se encuentran en diversos alimentos y mayormente en frutas y vegetales. Estos compuestos son de naturaleza lipofílica y responsables de diversos colores (amarillo, naranja, rojo) en los alimentos. Existen varios tipos de carotenoides, como la luteína y zeaxantina (Rowles y Erdman 2020); asimismo, la luteína y zeaxantina presentan ciertos efectos benéficos que promueven la salud de los ojos

y la piel (Zhang *et al.* 2014). El consumo de carotenoides a través de nuestra dieta alimenticia puede reducir el riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares gracias a su poder antioxidante (Kourouma *et al.* 2019).

Según Cazzonelli (2011) los carotenoides son pigmentos lipofílicos sintetizados y acumulados en los tejidos y órganos de los organismos fotosintéticos. Existen muchos tipos de carotenoides: luteína, neoxantina, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, etc. Además, los carotenoides juegan un papel en la pigmentación, lo que confiere una coloración amarilla a roja en flores, frutos y semillas.

La distribución y la función de los carotenoides en las semillas han sido poco estudiadas, a pesar de sus papeles fundamentales en las plantas, que incluyen fotosíntesis y síntesis de fitohormonas, pigmentación, estabilización de la membrana y actividad antioxidante. La composición y distribución de los carotenoides fue estudiada en semillas de una amplia gama de especies silvestres en las *Fabaceae*; durante el proceso de germinación el contenido total de pigmentos fotosintéticos aumentó en paralelo a los cambios en cantidad (la zeaxantina y anteraxantina disminuyeron y el  $\beta$ -caroteno aumentó) (Fernández-Marín *et al.* 2017).

Según Meléndez-Martínez (2019) los carotenoides son ampliamente conocidos como colorantes y algunos de ellos exhiben actividad de vitamina A. Existe amplia evidencia de que los carotenoides (y sus productos derivados y metabolitos) pueden estar involucrados en acciones biológicas que promueven la salud en humanos, además la luteína es uno de los compuestos bioactivos del grupo de los carotenoides que se viene discutiendo sobre la necesidad de establecer la ingesta dietética recomendada. Estos compuestos químicos pueden ser determinados a través de técnicas cromatográficas (HPLC) (Fernández-Marín *et al.* 2017).

Las legumbres son fuentes ricas en fitoquímicos (compuestos fenólicos y carotenoides), aunque no exista información suficiente sobre los carotenoides presentes en el lupino. Las lentejas han ganado gran interés debido a sus componentes bioactivos como luteína y zeaxantina; además, estos carotenoides son dominantes en las lentejas (Zhang *et al.* 2014). Los carotenoides también se encuentran en el aceite de soya y son de mucho interés, al igual que los tocoferoles, debido a que estos compuestos también son componentes solubles en

lípidos y beneficiosos para la salud. Los carotenoides presentes en el aceite de soya son: luteína, criptoxantina y zeaxantina (Slavin *et al.* 2009).

Kan *et al.* (2018), analizaron el contenido de carotenoides en 29 leguminosas (soya, lenteja, arveja, frijol, habas y otros) mediante HPLC, utilizando patrones de carotenoides mixtos (luteína y zeaxantina) y otros. En este estudio, se encontraron 8 isómeros de luteína y zeaxantina. Los dos picos principales identificados en los cromatogramas fueron: “*all-trans-lutein*” y “*all-trans-zeaxanthin*”. El frijol rojo y las lentejas presentaron el mayor contenido de carotenoides, 8.29 - 20.95  $\mu\text{g/g}$  y 4.53 - 21.34  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente, seguidos de la soya negra (4.41 - 6.09  $\mu\text{g/g}$ ) y el frijol caupí (6.62 - 9.46  $\mu\text{g/g}$ ). Sin embargo, el contenido de los carotenoides en frijol mungo y frijol blanco fueron muy bajos: 0.03 - 0.07  $\mu\text{g/g}$  y 0.05 - 0.25  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente.

Según los resultados de Slavin *et al.* (2009) existe una gran variación por contenido en carotenoides en los diferentes tipos de aceites de soya. Los aceites de soya “Manokin” y “MD 03-5517” tuvieron la mayor cantidad de luteína (5142 y 4887  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente) y criptoxantina (13.5 y 24.1  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente). El aceite de soya “MD 03-5527” tuvo la menor cantidad de luteína (1256  $\mu\text{g/g}$ ), y criptoxantina (0.1  $\mu\text{g/g}$ ). Asimismo, estos investigadores no encontraron ninguna correlación o efecto significativo entre el perfil de ácidos grasos y el contenido de carotenoides presentes en la soya.

## **2.5 PROCESAMIENTO TECNOLÓGICO DEL LUPINO**

### **2.5.1 Desamargado**

El lupino contiene alcaloides del tipo quinolizidina, en diferentes especies del lupino. Estos alcaloides son solubles en solventes orgánicos, como el agua. Entre los más principales alcaloides son la lupanina y esparteína. Los alcaloides son compuestos amargos y tóxicos (Carvajal-Larena *et al.* 2016). Por lo tanto, el proceso de desamargado es esencial para remover los alcaloides presentes en el lupino.

El método más utilizado y tradicional para retirar los alcaloides es mediante una extracción con agua o lavado acuoso. Para ello es necesario hervir durante una hora aproximadamente, colocándolo luego en bolsas de tela permeable y dejándolo en agua corriente por 10 días. Este método pierde un 45 por ciento de la materia seca (Faris *et al.* 2008). Asimismo, Jacobsen y Mujica (2006) y Erbas (2010) mencionaron que el desamargado tradicional de

los granos de lupino consiste de varias etapas, como la hidratación, cocción, lavados sucesivos en agua durante 5 a 7 días y secado. Debido a la eficacia del método para retirar alcaloides, las empresas optan por utilizar el método tradicional. Sin embargo, Ertaş y Bilgiçli (2012) estudiaron diferentes métodos de desamargado, y concluyeron que el método tradicional de desamargado es un método largo y demora mucho tiempo.

El lavado también se puede realizar mediante sistemas de ultrasonido para mejorar el proceso de desamargado. El ultrasonido es una onda sonora con frecuencias por encima generalmente de 15 kHz. La onda sonora transporta energía por medio del efecto de compresión y expansión de las moléculas durante el lavado. En los líquidos generalmente el ultrasonido hace que libere energía en las superficies de las partes a lavar (Wang *et al.* 2016).

El control residual de alcaloide más simple del proceso de desamargado es mediante el método por titulación o por fotometría. Existen otros métodos para detectar el alcaloide residual, tal como HPLC. Cortés-Avenidaño *et al.* (2020) encontraron niveles residuales (en promedio, 0.001 g/100 g de materia seca) de alcaloides mediante HPLC, en diez genotipos de *L. mutabilis*, después del proceso de desamargado (lavado acuoso).

### **2.5.2 Extrusión**

La extrusión se ha convertido en un importante proceso alimenticio en la fabricación de pastas, cereales listos para el consumo, bocadillos, alimentos para mascotas y proteínas vegetales texturizadas (TVP). Un extrusor consiste en uno o dos tornillos que se ajustan estrechamente y que giran dentro de un cilindro estacionario. Los ingredientes pre-moldeados y acondicionados entran en el tornillo donde son transportados, mezclados y calentados por una variedad de procesos. El producto sale de la extrusora a través de una matriz donde suele soplar y cambia de textura a partir de la liberación de vapor y fuerzas normales (Ramos-Díaz *et al.* 2015).

El extrusor es un proceso de alta temperatura y corto tiempo, que minimiza las pérdidas de vitaminas y aminoácidos, y modifica favorablemente el color, sabor, forma y textura del producto. La extrusión ha sido ampliamente aplicada en la producción de alimentos nutritivos (Ramachandra y Thejaswini 2015). Una de las ventajas de la extrusión, en el caso de las leguminosas, es la reducción de los compuestos antinutricionales y a la vez mejora la digestibilidad. Asimismo, las legumbres se caracterizan mayormente por presentar un

contenido relativamente grande de proteínas y carbohidratos complejos, y gracias a esta técnica, estos nutrientes se pueden modificar favorablemente, creando nuevos productos (Ghumman *et al.* 2016).

Alonso *et al.* (2000), investigaron el proceso de extrusión de algunas leguminosas, como el haba y frijol. En sus hallazgos demostraron que la extrusión es el tratamiento térmico más eficaz, en comparación con el proceso de descascarado, remojo y germinación, para mejorar la digestibilidad de las proteínas. Las habas y frijoles extruidos presentaron altos niveles de digestibilidad *in vitro* de las proteínas (83 - 87.4%) y pequeñas cantidades de factores antinutricionales (inhibidores de tripsina y quimotripsina, ácido fítico). Por otro lado, Ghumman *et al.* (2016), señalaron que las condiciones de operación del proceso de extrusión, como la temperatura de extrusión y la humedad del alimento, influyen de manera positiva en la digestibilidad *in vitro* y en la estabilidad térmica de las proteínas de las lentejas y frijoles verdes (leguminosa muy consumida en la India).

Palanisamy *et al.* (2018), realizaron el proceso de extrusión de concentrados de proteínas de lupinos y mezclas de aislados, y demostraron que los parámetros de extrusión: temperatura del barril (138-180 °C), alimentación de agua (40-68%) y tornillo velocidad (400-1800 rpm), influyen en las propiedades del lupino extruido (color, fuerza de corte, rendimiento de cocción, microestructura y digestibilidad *in vitro*). La temperatura de extrusión disminuye la digestibilidad, mientras que el aumento de agua en la alimentación del extrusor incrementa la digestibilidad *in vitro* de las proteínas del lupino. La velocidad del tornillo no tiene un efecto significativo.

En el caso de la soya, Lin *et al.* (2002) demuestran que el factor más importante durante el proceso de extrusión es el contenido de humedad del alimento a la entrada del extrusor. Por otro lado, el uso de la proteína de lupino y soya es factible para producir análogos de carne, o productos texturizados a través del proceso de extrusión.

### **2.5.3 Secado por aspersion**

El secado por aspersion o también llamado atomización, es la producción de polvos altamente dispersados a partir de un alimento en estado líquido, por evaporación del disolvente (Ferragut *et al.* 2015). Esto se consigue mezclando un gas calentado con un fluido atomizado (pulverizado) de gotitas de gran proporción de superficie a masa, idealmente de

igual tamaño, dentro de un recipiente (cámara de secado), haciendo que el disolvente se evapore uniformemente y rápidamente a través del contacto directo.

El secado por pulverización se puede utilizar en una amplia gama de aplicaciones en las que se requiere la producción de un polvo que fluye libremente. Este método de deshidratación se ha convertido en el más exitoso en las áreas de bebidas (Wang *et al.* 2016; Corbo *et al.* 2014). La ventaja de este método es que brinda un producto final de calidad debido al corto tiempo de contacto entre el alimento a secar y el calor. Otra ventaja del método, es que brinda un producto final fácil de transportar y almacenar a costos relativamente bajos (Jinapong *et al.* 2008). En tal sentido, la atomización es un método apropiado para poder utilizarlo en la deshidratación de las bebidas de soya, lupino y otros. Asimismo, la encapsulación por atomización es una tecnología emergente que permite lograr muchas innovaciones en el segmento de la producción de alimentos funcionales; por consiguiente, la encapsulación de diversos nutrientes mediante agentes encapsulantes, como la maltodextrina y goma arábica, puede aumentar considerablemente la estabilidad y vida útil del producto (Uzun *et al.* 2007).

Existen varios trabajos de investigación que estudiaron la producción de polvos de leche de soya mediante el método de secado por aspersion. Jinapong *et al.* (2008), estudiaron diversos parámetros, como: combinaciones de temperatura del aire de entrada, velocidad de alimentación, velocidad del atomizador en el aire de salida, temperaturas del producto, y tamaño de partícula de los polvos (soya en polvo). También se han llevado a cabo estudios relacionados a la combinación de procesos, como la ultrafiltración y secado por aspersion (Perez-Munor y Flores 1997). Asimismo, el secado por aspersion de la leche de soya se realizó variando las concentraciones (0% - 20%; p/v) del agente encapsulante (maltodextrina), siendo 10% la concentración óptima (Jinapong *et al.* 2008).

En el caso del lupino, no hay suficiente información acerca de todo un estudio completo sobre el secado por aspersion de bebidas o sustitutos lácteos a base de esta leguminosa. Algunos investigadores como Hickisch *et al.* (2016), investigaron la influencia del tratamiento térmico de las alternativas lácteas a base de lupino y diferentes bacterias del ácido láctico productoras de exopolisacárido (EPS) sobre las características físicas de yogurt a base de las alternativas lácteas de lupino. Estos investigadores elaboraron una alternativa láctea de lupino a partir del aislado de proteína de *Lupinus angustifolius cv. Boregine*. Adicionalmente, existen mayormente investigaciones en torno a la elaboración de leches

vegetales a partir del lupino, como es el caso de los investigadores Jiménez *et al.* (2000), quienes produjeron productos similares a la leche y al yogur a partir de semillas de *Lupinus campestris*.

## **2.6 INDICADORES DE DAÑO TÉRMICO**

### **2.6.1 Furosina**

La furosina es un indicador de daño térmico producida por hidrólisis ácida de los compuestos de Amadori (por ejemplo, *N-fructosalisina*). Los compuestos de Amadori son el resultado de la transposición de la base de Schiff, formando una cetona, a su vez estos compuestos son los precursores de los productos de glicación avanzada, durante la reacción de Maillard (Rufián-Henares *et al.* 2007). Los componentes de Amadori, se forman a partir de las reacciones entre los aminoácidos y carbohidratos reductores, y generan una disminución de la disponibilidad de estos nutrientes. Estas reacciones ocurren con el aminoácido esencial lisina (aminoácido limitante en muchas proteínas). La furosina y otros derivados de furoilmetilo se forman a partir de los compuestos de Amadori. Los productos que genera la reacción de Maillard, durante el procesamiento de los alimentos, más utilizados como marcadores de la calidad nutricional de los alimentos procesados son: furosina, hidroximetilfurfural, pirralina y pentosidina. La furosina fue uno de los primeros productos representativos generados a partir del componente de Amadori "*N-fructosalisina*", durante las primeras etapas de reacciones de Maillard; asimismo, es un marcador directo de los productos generados de la reacción de lisina (Hidalgo *et al.* 2019; Delgado-Andrade *et al.* 2007; Rufián-Henares *et al.* 2007).

La furosina es un compuesto químico, de relevancia analítica, tecnológica y nutricional, que se genera en condiciones menos severas de tratamiento térmico. Por lo tanto, es de suma importancia analizar los alimentos ligeramente procesados, con el fin de controlar la formación de este compuesto químico (Delgado-Andrade *et al.* 2007; Rufián-Henares *et al.* 2007). Este indicador de daño térmico incentivó la investigación en el campo del tratamiento térmico de las proteínas. Asimismo, los métodos para analizar este indicador aumentaron sustancialmente en todos los países; además se convirtió en un tema de interés mundial. Aunque estos métodos no parecen ser eficientes para alimentos procesados que contienen bajos niveles de furosina (leche pasteurizada y queso mozzarella). Sin embargo, es un buen índice de daño por calor para los productos procesados a base de tomate y ajo deshidratado. Por lo tanto, es un indicador muy sensible para la detección temprana de los cambios de

calidad causados por la reacción de Maillard y son adecuados para controlar el proceso de deshidratación (Rufián-Henares *et al.* 2008).

La rapidez y bajo costo del análisis de este indicador, lo hacen atractivo para el control de calidad de muchos alimentos, como productos de panadería (Hidalgo *et al.* 2019) y productos lácteos moderadamente tratados con calor (Delgado-Andrade *et al.* 2005; Tirelli y Pellegrino 1995). Nangpal *et al.* (1990), estudiaron el aumento de los valores de furosina en leche calentada (UHT), en función de la temperatura, y observaron que el contenido de furosina no aumenta linealmente con el aumento del calor. Además, en muestras más severamente calentadas, los contenidos de furosina disminuyen. En este estudio, explican que la razón de la disminución, es el progreso de la reacción de Maillard, que lleva a la formación de otros productos intermedios y productos finales. Adicionalmente, Hidalgo *et al.* (2019), encontraron contenidos de furosina (300 – 500 mg/100 g proteína) en galletas de agua; y observaron que los contenidos de este compuesto aumentaron de acuerdo con los porcentajes de enriquecimiento de las harinas para la elaboración de galletas de agua. Asimismo, estos investigadores concluyeron que se pudo procesar las galletas de agua con bajo daño térmico.

Los contenidos de furosina han sido analizados en productos lácteos, cereales, pastas, miel y otros productos donde se les aplicó un tratamiento térmico moderado. Sin embargo, no hay suficiente información sobre el contenido de furosina en leguminosas procesadas, especialmente en el lupino. La relevancia del contenido de furosina, en los productos procesados a partir de leguminosas, cereales y otros, también es significativa para fines reglamentarios (Hidalgo *et al.* 2019; Rufián-Henares *et al.* 2007; Delgado-Andrade *et al.* 2007; Nangpal *et al.* 1990).

### **2.6.2 Hidroximetilfurfural (HMF)**

Hidroximetilfurfural es un compuesto del grupo furano, que se forma como un intermediario en la reacción de Maillard, y por la deshidratación directa de azúcares en condiciones ácidas (caramelización) durante los tratamientos térmicos aplicados a los alimentos (Kroh 1994). En condiciones ácidas, el compuesto HMF puede formarse incluso a bajas temperaturas, aunque sus concentraciones aumentan a medida que aumentan las temperaturas (Pérez-Locas y Yaylayan 2008). Además de la temperatura, la tasa de formación de HMF en los alimentos también depende del tipo de azúcar, pH y actividad del agua que tiene el alimento (Gökmen *et al.* 2008; Lee y Nagy 1990; Kroh 1994).

El HMF se forma a través de las reacciones de Maillard y caramelización que ocurren durante el procesamiento de alimentos; asimismo, estas reacciones contribuyen favorablemente al color, sabor y aroma de los alimentos procesados. Desafortunadamente, la formación de HMF sigue las mismas vías de reacciones que conducen a compuestos marrones y saborizantes. De la misma forma, se ha encontrado una alta correlación entre el contenido de HMF y el desarrollo del pardeamiento; por consiguiente, controlar la temperatura y reducir el tiempo de calentamiento probablemente reduzca la presencia de HMF y al mismo tiempo una reducción de la formación del color dorado, que este último potencialmente puede comprometer la calidad y la aceptabilidad del producto final (Capuano *et al.* 2008).

Este indicador es un parámetro utilizado por la industria de alimentos para evaluar el daño generado por el calor durante el procesamiento de productos alimenticios, como frutas procesadas o deshidratadas, entre otros productos procesados (Rufián-Henares *et al.* 2008). La cantidad de HMF presente en los alimentos está directamente relacionada con el calor (producto del tratamiento térmico) y con la cantidad de carbohidratos presente en el alimento. Otra fuente de la presencia de HMF en los alimentos procesados, está representada por los ingredientes utilizados en la formulación, como, por ejemplo: las soluciones de caramelo o la miel, entre otros. Las concentraciones de HMF en los productos procesados pueden variar dependiendo del tipo de producto, incluso a veces superando 1 g/kg en ciertos productos como: frutas secas y caramelos (Rada-Mendoza *et al.* 2004; Akkan *et al.* 2001; Ibarz *et al.* 2000). Aunque las concentraciones de HMF son extremadamente altas en algunos alimentos como: frutas secas, caramelo y vinagre; el pan y café son los alimentos que contribuyen la ingesta de HMF (Murkovic y Pichler 2006).

Ait-Ameur *et al.* (2007) reportaron que la utilización de sacarosa en la elaboración de galletas produce un mayor nivel de HMF, cuando se hornea a temperaturas mayores a 250°C. Pérez-Locas y Yaylayan (2008) mencionaron que se forma un catión fructofuranosilo altamente reactivo a partir de sacarosa a altas temperaturas, que produce HMF muy rápidamente. Sin embargo, Hidalgo *et al.* (2019), encontraron contenidos bajos de HMF (0.5 – 6 mg/kg de materia seca, aproximadamente) en galletas de agua; además observaron que estos contenidos aumentaron de acuerdo con los porcentajes de enriquecimiento de las harinas para la elaboración de galletas de agua. Asimismo, concluyeron que se pudo procesar

las galletas de agua con bajo daño térmico. Adicionalmente, existe un efecto del pH de la masa de harina sobre la formación de HMF. En tal sentido, el aumento del pH de la masa de harina da como resultado una disminución de los contenidos de HMF en los productos de panadería (Gökmen *et al.* 2007). Por lo tanto, el pH bajo y un catalizador ácido, durante el procesamiento con calor, promueve la descomposición de los derivados del furano (Lee y Nagy 1990).

HMF también se puede encontrar en productos de panadería, malta, jugos de frutas, café y vinagre. Sin embargo, no hay suficiente información sobre el contenido de HMF en productos a base de leguminosas, ni mucho menos información sobre productos a base de lupino. En general, el HMF podría usarse como marcador de calidad para una amplia gama de frutas procesadas, café, miel y leche (Murkovic y Pichler 2006; Gökmen y Senyuva 2006; Rada-Mendoza *et al.* 2004). HMF también se usa para monitorear los procesos de calentamiento aplicados a productos de cereales como el secado de pasta, horneado de pan, tostado de rebanadas de pan, así como extrusión de cereales para bebés y cereales para el desayuno (Rufián-Henares *et al.* 2006). El rango de contenido de HMF de algunos productos alimenticios es: cereales para el desayuno (6.9 - 240.5 mg/kg) (Rufián-Henares *et al.* 2006), tostadas de pan (11.8 - 87.7 mg/kg) (Ramírez-Jiménez *et al.* 2000), galletas (0.5 - 74.5mg/kg) (Ait-Ameur *et al.* 2007) y alimentos para bebés a base de leche (0.18 - 0.25 mg/kg) (Gökmen y Senyuva 2006).

### **2.6.3 Glucosilisomaltol (GLI)**

Glucosilisomaltol es un producto que se forma durante el calentamiento de la maltosa y aminoácidos, especialmente la glutamina. Este compuesto es utilizado como un indicador de la reacción de la caramelización en cereales para infantes y en pan (Hidalgo y Brandolini 2011). El glucosilisomaltol es producido por la reacción avanzada de Maillard en los alimentos, como cereales, pan y alimentos para bebés, y es útil para controlar la reacción de Maillard durante el procesamiento y almacenamiento de cereales para bebés y la cocción del pan (Solís-Casanova *et al.* 2011; Guerra-Hernández *et al.* 2002).

El calentamiento de los azúcares lactosa o maltosa, carbohidratos con enlaces 1,4-glucosídicos con aminos primarios o secundarios en solución acuosa tamponada durante un tiempo prolongado produce derivados de isomaltol (Kramholer *et al.* 1992). Cuando las soluciones (pH 6.5) de azúcares (fructosa, glucosa, maltosa o maltotriosa) en presencia de

aminoácidos (glutamina, asparagina o arginina) se calientan a 80°C durante 12 horas producen glucosilisomaltol; asimismo, si se calienta a altas temperaturas y por tiempos prolongados específicamente una solución de maltosa con glutamina produce glucosilisomaltol. Este indicador de daño térmico se analiza mediante técnicas cromatográficas (HPLC) (Solís-Casanova *et al.* 2011; Resmini *et al.* 1993). Los cereales para bebés contienen cantidades considerables de maltosa y glutamina; por consiguiente, estos productos pueden presentar contenidos de glucosilisomaltol. En tal sentido, el glucosilisomaltol es útil para controlar los procesos de tostado, horneado y secado, y las condiciones de almacenamiento de los diferentes productos a base de cereales (Fernandez-Artigas *et al.* 2001).

Guerra-Hernández *et al.* (2002) encontraron que el contenido de glucosilisomaltol en muestras de cereales para bebés fue muy bajo (0.48 mg/kg), debido a que este compuesto surge de la reacción avanzada de Maillard. Asimismo, conforme aumentó el tiempo de almacenamiento de los productos a base de los cereales se incrementó la concentración del glucosilisomaltol (0.68 – 1.23 mg/kg). Asimismo, Solís-Casanova *et al.* (2011) mencionaron que la vida útil de los cereales para bebés es muy larga, y las condiciones de almacenamiento pueden formar productos avanzados de la reacción de Maillard (glucosilisomaltol); asimismo, encontraron que el contenido inicial de GLI (0.48 mg/kg) generado durante la fabricación de los cereales para bebés aumentó 16 veces durante las cuatro semanas de almacenamiento a 55 °C y 0.65 de actividad de agua. En tal sentido, el factor tiempo y las condiciones de almacenamiento tienen un efecto multiplicador de las concentraciones.

En pan antes de la cocción (horneado) no se encontraron cantidades detectables de glucosilisomaltol; después de 10 minutos a 190 °C se detectaron 0.82 mg/kg, y después de 30 minutos aumentaron a 20.9 mg/kg, indicando que existe una correlación lineal entre la presencia de glucosilisomaltol y el tiempo de cocción (horneado) (Guerra-Hernández *et al.* 2002). Por otro lado, Hidalgo *et al.* (2019), encontraron contenidos de glucosilisomaltol (GLI) en galletas de agua, dentro del rango 0.3 – 1.8 mg/kg de materia seca, aproximadamente; asimismo, observaron que los contenidos de glucosilisomaltol aumentaron de acuerdo con los porcentajes de enriquecimiento de las harinas con otros cereales germinados. Sin embargo, se pudo procesar este tipo de galletas con bajo daño térmico.

La mayoría de estudios respecto a este nuevo indicador de daño térmico se han realizado en productos alimenticios para bebés, productos hechos a base de cereales y harinas, pero todavía se carece de información sobre este indicador en productos a base de leguminosas, como lupino, soya, entre otros.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN**

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de investigación y análisis de alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú; y en el laboratorio de ciencia de alimentos de la Università degli Studi di Milano, Italia.

#### **3.2 MATERIAL ORGÁNICO**

Se utilizaron tres genotipos de *Lupinus mutabilis* Sweet de diferentes regiones del Perú (*Altagracia* de Ancash, *Andenes* de Cusco, y *Yunguyo* de Puno), suministrados por el Programa de Leguminosas de Grano y Oleaginosas de la Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.

#### **3.3 REACTIVOS Y MATERIALES**

Los principales reactivos que se usaron en los análisis fueron: goma arábica (Frutarom), maltodextrina (Frutarom), etanol 99.9% (Merck, Alemania), ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA), folin-Ciocalteu (Merck, Alemania), carbonato de sodio (Merck, Alemania), metanol (Merck, Alemania), diclorometano (Merck, Alemania), ABTS (Sigma-Aldrich, EUA), Trolox (Sigma-Aldrich, EUA), DPPH (Sigma-Aldrich, EUA), pepsina (Sigma-Aldrich, EUA), pancreatina (Sigma-Aldrich, EUA), estándares químicos: glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, furosina, hidroximetilfurfural, lucosilisomaltol, tocoferoles, luteína, zeaxantina (Sigma, St. Louis, MO, USA). Y otros reactivos principales adquiridos de Merck (Alemania), como: ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, azida de sodio. Los principales materiales son: filtros de membrana de PTFE de 0.22 y 0.45  $\mu\text{m}$  (Diana Beck Scientific, Angera, Italia).

#### **3.4 EQUIPOS**

Secador de bandeja de aire caliente (Xinhang, SW-10S, China); molino de cuchillas Grindomix GM 200 (Retsch GmbH, Alemania); extrusor de laboratorio DSE32 (Jinan

Dingrun Machinery Co; China); licuadora (Oster®, BLSTBC4129-053, México); secador de aspersión SD-Basic de laboratorio (LabPlant, Reino Unido); colorímetro Minolta Chroma meter II (Minolta Italia SpA, Italia); aqua Lab modelo Serie 3 TE (Decagon Devices, Inc; Pullman, WA, USA); HPLC con los siguientes accesorios: columna de Prevail Carbohydrate ES 5 µm, 250 x 4.6 mm (Grace Davison Discovery Science, IL, USA), precolumnna Prevail (Grace Davison Discovery Science, IL, USA), horno de columna L-2300 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón), bomba L-2130 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón); baño termostático (Heidolph, MR2002, Alemania); centrífuga Centrikon T-42K (Kontron Instruments, Bletchley, Reino Unido); lector de micropozos (PowerWave XS2 Biotek).

### **3.5 PROCESAMIENTO DE LOS GRANOS DEL LUPINO**

#### **3.5.1 Desamargado**

El desamargado de los granos de lupinos, necesario para eliminar los alcaloides, se realizó mediante lavados sucesivos según Jacobsen y Mujica (2006), Erbas (2010) y Ertaş y Bilgiçli (2012), con modificaciones, tal como se indica a continuación: los granos de lupino se hidrataron durante 12 horas a temperatura ambiente con una relación de lupino:agua de 1:6 (p/v). Los granos hidratados se cocieron a temperatura de ebullición (granos hidratados:agua 1:3 p/v) durante 1 h, con cambios de agua cada 30 minutos; luego se almacenaron en agua (1:3 p/v) a temperatura ambiente durante 5 días, cambiando el agua a diario. Finalmente, los granos se secaron a 50°C en un secador de bandeja de aire caliente (Xinhang, SW-10S, China) durante 18 horas y posteriormente se almacenaron a oscuridad a temperatura ambiente hasta el molido.

#### **3.5.2 Molienda**

Los granos de lupino amargos y desamargados fueron molidos con un molino de cuchillas Grindomix GM 200 (Retsch GmbH, Alemania) a 6000 RPM durante 35 s; cada harina (harina amarga y desamargada), tamizada a través de una malla de 2.0 mm, fue empaquetada en bolsas de polietileno de alta densidad con cierre hermético y almacenada en refrigeración a 4°C, hasta su análisis.

#### **3.5.3 Extrusión**

La extrusión se realizó a partir de la harina desamargada, con un extrusor de laboratorio DSE32 (Jinan Dingrun Machinery Co; China) a una presión de 20 MPa. La harina desamargada tuvo un 35% de humedad (antes de ingresar al extrusor) y las temperaturas en

las diferentes secciones de la extrusora fueron 95, 120, 140 y 130 °C, respectivamente (Lampart-Szczapa *et al.* 2006). El lupino extruido fue molido con un molino de cuchillas Grindomix GM 200 (Retsch GmbH, Alemania) a 6000 RPM durante 35 s. La harina extruida se envasó en bolsas de polietileno de alta densidad con cierre hermético y se almacenaron en refrigeración a 4 °C, hasta su posterior análisis.

#### **3.5.4 Secado por aspersión**

Los granos enteros de lupino desamargados se hidrataron durante 12 horas a temperatura ambiente (1:6 p/v de lupino:agua), se pelaron y se molieron durante 15 minutos en una licuadora (Oster®, BLSTBC4129-053, México) después de agregar agua hervida fría (relación 1:4 w/v), luego se filtró a través de una malla de tela fina para eliminar el material grueso, producto de la molienda. La bebida de lupino se introdujo en un secador de aspersión SD-Basic de laboratorio (LabPlant, Reino Unido), con la adición (6% p/p) de un agente de recubrimiento (goma arábica o maltodextrina). El secado por aspersión de la bebida de lupino se realizó bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de entrada 170 °C, temperatura de salida 80 - 90 °C (Boostani *et al.* 2017), 400 - 600 kPa y velocidad de alimentación 12.5 mL/min. El lupino en polvo, producto del secado por aspersión, fue almacenado en frascos de vidrio oscuro herméticos a 4 °C (refrigeración), hasta el día de su análisis.

### **3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.6.1 Determinación de la composición química proximal**

La composición química proximal de todas las muestras fue determinada mediante los métodos analíticos oficiales de la Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (AOAC 2000): proteína (Método 920.87, factor de conversión de 6.25), lípido (Método 923.05), ceniza (Método 923.03) y humedad (Método 925.10). El contenido total de carbohidrato se determinó por diferencia. Los resultados sobre el contenido de proteína, lípido, ceniza y carbohidrato fueron expresados en base seca.

#### **3.6.2 Determinación de la digestibilidad *in vitro* de las proteínas**

La digestibilidad *in vitro* de las proteínas en las muestras fue determinada mediante la metodología propuesta por Almeida *et al.* (2015), con modificaciones, tal como se detalla a continuación: se suspendieron exactamente 250 mg de cada muestra en 15 ml de HCl 0.1 N que contenía 1.5 mg/mL de pepsina y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un baño de

agua. La hidrólisis de pepsina se detuvo con la adición de 7.5 mL de NaOH 0.5N. La digestión pancreática se inició con la adición de 10 mL de tampón fosfato de 0.2 mol/L (pH 8.0) que contenía 10 mg de pancreatina y de 1 mL de azida de sodio 0.005 mol/L para prevenir el crecimiento microbiano; la mezcla se incubó durante 18 horas a 37 °C en un baño de agua. Después de la hidrólisis pancreática, se agregaron 1 mL de ácido tricloroacético (10 g/100 mL), después se centrifugó a 1000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se recolectó y el contenido de proteína total ( $N \times 6.25$ ) se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC 2000); se utilizó aislado de caseína en polvo como referencia. Los valores de digestibilidad se calcularon con la ecuación:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = (\text{Ps/Pt}) \times 100$$

Donde Ps y Pt representan el contenido de proteína en el sobrenadante y el contenido de proteína total, respectivamente.

### 3.6.3 Determinación del color

El color, se midió con un colorímetro de reflectancia Minolta Chroma Meter II (Minolta Italia SpA, Italia), y se expresó las unidades de color mediante el sistema de coordenadas CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , donde  $L^*$  es luminosidad,  $a^*$  es enrojecimiento y  $b^*$  es amarillo; la diferencia de color ( $\Delta E$ ) fue medida de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]^{1/2}$$

### 3.6.4 Determinación de la actividad de agua ( $a_w$ )

La actividad de agua se determinó utilizando el instrumento Aqua Lab modelo Serie 3 TE (Decagon Devices, Inc; Pullman, WA, USA).

### 3.6.5 Determinación de los azúcares

La fructosa, la glucosa, la maltosa y la sacarosa se determinaron mediante HPLC; la preparación de la muestra se realizó siguiendo el método descrito por Hidalgo y Brandolini (2011), tal como se explica a continuación: 1 g de muestra pesada en un matraz aforado de 25 mL y 10 mL de etanol al 80% (v/v) se agregaron juntos. El matraz volumétrico se colocó en un baño termostático (Heidolph, MR2002, Alemania) durante 30 minutos a 80 °C bajo agitación magnética. Después de enfriar, la muestra se colocó en un tubo de plástico de 10

mL y se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos utilizando una centrífuga Centrikon T-42K (Kontron Instruments, Bletchley, Reino Unido); el sobrenadante se recogió y el residuo se sometió a un ciclo adicional de extracción (con 10 mL de etanol al 80%) y centrifugación.

Los sobrenadantes de cada extracción se agruparon y filtraron a través de una membrana de PTFE de 0.45  $\mu\text{m}$  (Diana Beck Scientific, Angera, Italia). La solución filtrada (20  $\mu\text{L}$ ) se inyectó en el sistema de HPLC en las siguientes condiciones operativas: columna de Prevail Carbohydrate ES 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm (Grace Davison Discovery Science, IL, USA); Precolumn Prevail Carbohydrate ES 5  $\mu\text{m}$ , 7.5 x 4.6 mm, (Grace Davison Discovery Science, IL, USA); horno de columna a 30 °C, L-2300 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón); fase móvil acetonitrilo-agua (75:25, v/v); caudal 1 mL/min; bomba L-2130 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón). Los azúcares fueron detectados por ELSD 3330 (temperatura 45 °C, ganancia 8, flujo de nitrógeno 1.5 mL/min; (Grace Davison Discovery Science, Alltech, MI, Italia). El sistema de HPLC fue controlado por el software EZChrom Client/Server versión 3.1.7.

Para la cuantificación de picos, las curvas de calibración de azúcares se construyeron utilizando 15 concentraciones diferentes de fructosa (entre 12.8 y 310 mg/L), 19 concentraciones diferentes de glucosa (entre 12.6 y 428 mg/L), 19 concentraciones diferentes de maltosa (entre 12.1 y 482 mg/L) y 15 concentraciones diferentes de sacarosa (entre 13.0 y 407 mg/L), como estándares (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los límites de detección de las soluciones estándar de fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa fueron 1.11, 1.09, 1.11 y 1.09 mg/L, respectivamente.

### **3.6.6 Determinación de los índices de daño térmico**

#### **a. Furosina**

La furosina se determinó siguiendo el método descrito por Hidalgo y Brandolini (2011), tal como se detalla a continuación: se agregaron 8 ml de HCl 8 N a aproximadamente 400 mg de muestra, pesados con precisión en viales de Pyrex con tapa rosca de 10 mL. Después de burbujear nitrógeno durante 1 min, los viales se sellaron y se mantuvieron a 110 °C durante 23 h. Posteriormente, la muestra se filtró a través de una membrana de PTFE de 0.45  $\mu\text{m}$  (Diana Beck Scientific, Angera, Italia). Se realizó una extracción en fase sólida de un volumen de filtrado de 0.5 mL en un cartucho Millipore Sep-Pak C18, previamente humedecido con metanol y agua. La furosina se diluyó utilizando 3 mL de HCl 3 N, y se

inyectaron 20  $\mu$ L de la dilución en un aparato de cromatografía líquida que consta de dos bombas de 510 HPLC, un controlador de gradiente automático 680 y un detector de longitud de onda múltiple programable 490, todos de Millipore Aguas (Milford, MA, USA). El instrumento se conectó a un Chromatointegrator D-2500 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemania).

Las condiciones operativas del análisis de HPLC de furosina fueron las siguientes: una columna dedicada a furosina C8 (250 x 4.6 mm, Alltech Italia S.R.L; Milán, Italia); temperatura de la columna de 35 °C; detección de longitud de onda múltiple de 280 nm; fase móvil (A) 0.4% de ácido acético en agua, (B) 0.3% de cloruro de potasio en disolvente A; caudal de 1.2 mL/min. El gradiente de elución, expresado como proporción del eluyente B, fue: condición inicial, 2% durante 13.5 minutos; de 2% a 50% en 7 minutos, 50% durante 1 minuto; del 50% al 2% en 1.5 min, 2% durante 10 min. Se construyó una curva de calibración utilizando nueve concentraciones diferentes en HCl 3 N (entre 0.33 y 5.13  $\mu$ mol/L de dihidrocloruro de furosina) (NeoMPS, PolyPeptide Laboratories, Strasbourg, Francia). El límite de detección fue de 0.11  $\mu$ mol/L para la solución estándar. Los resultados son expresados en miligramos de furosina/100 g de proteína.

#### **b. Hidroximetilfurfural y glucosilisomaltol**

Para la determinación de hidroximetilfurfural “HMF” y glucosilisomaltol “GLI”, la muestra se preparó siguiendo el método propuesto por Hidalgo y Brandolini (2011), que a continuación se explica: 5 mL de buffer de borato 1 M pH 8.2 se agregaron a 0.5 g de muestra, se sonicaron durante 30 min a 35 °C y se centrifugaron a 13000 x g durante 15 min. El sobrenadante se recogió y el residuo se sometió a dos ciclos adicionales de 2 mL de agua para extracción y centrifugación. Los sobrenadantes de cada extracción se agruparon y filtraron a través de una membrana de nailon de 0.45  $\mu$ m (Diana Beck Scientific, Angera, Italia). La solución filtrada (20  $\mu$ L) se inyectó en el sistema de HPLC siguiendo el método propuesto por Rufián-Henares *et al.* (2006) citado por Hidalgo y Brandolini (2011), bajo las siguientes condiciones operativas: columna Prevail C18, 5  $\mu$ m, 4.6 mm x 250 mm (Grace Davison Discoverey Sciences, Deerfield, IL, USA); precolumna Prevail C18, 5  $\mu$ m, 4.6 mm x 7.5 mm (Grace Davison Discoverey Sciences, Deerfield, IL, USA); horno de columna a 32 °C, L-2300 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón); fase móvil, acetonitrilo-agua (5:95, v/v); caudal, 1 mL/min; bomba L-2130 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón).

Los compuestos se detectaron a 280 nm por el Detector de Matriz de Diodos L2450 Elite LaChrom (Merck, Hitachi, Japón). El sistema de HPLC fue controlado por el software EZChrom Client/Server versión 3.1.7. Para la cuantificación de los picos, se construyeron curvas de calibración de compuestos utilizando 13 concentraciones diferentes (entre 0 y 6.25 mg/L) de HMF (Safc, St. Louis, MO, USA). Sobre la base de las curvas de calibración, los límites de detección de HMF en las soluciones estándar fueron de 0.05 mg/L. La cuantificación de GLI se calculó considerando el factor de respuesta de HMF a 280 nm. Los resultados se expresan en mg/kg de DM. Todas las mediciones analíticas se realizaron dos veces; los resultados se presentaron como medias ( $\pm$  desviación estándar).

### **3.6.7 Determinación de la capacidad antioxidante**

#### **a. Método DPPH**

Para la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH de las muestras de lupino andino, se utilizó las metodologías propuestas por Yilmaz *et al.* (2015) y Martínez-Villaluenga *et al.* (2009) con modificaciones, que a continuación se detallan: se pesó 20 mg de muestra de lupino andino y se añadió 500  $\mu$ L de solución DPPH (previamente preparada a la concentración de 0.4 mg/mL con solución acuosa de metanol al 80%). Luego, se añadió 700  $\mu$ L de solución acuosa de metanol al 80% (v/v). Posteriormente, se mezcló en un vortex a 1300 RPM durante 15 segundos. Para la extracción de los metabolitos, la mezcla se agitó a 200 RPM durante 1 hora en oscuridad, luego se centrifugó a 9000 RPM por 15 minutos, y se retiró el sobrenadante para la lectura de la absorbancia. Finalmente, se colocó cuidadosamente 130  $\mu$ L del sobrenadante en el micropozo de la placa, luego se leyó la absorbancia a 517 nm en un lector de micropozos (PowerWave XS2 Biotek). Se utilizó solución acuosa de metanol al 80% como blanco. La capacidad antioxidante fue calculada a partir de una curva estándar de Trolox (1.9 – 30.8  $\mu$ g Trolox/mL) y los resultados fueron expresados como  $\mu$ mol Trolox por gramo de muestra de lupino andino en base seca. La curva estándar de Trolox fue ensayado bajo las mismas condiciones para una muestra de lupino andino.

#### **b. Método ABTS<sup>+</sup>**

El análisis de la capacidad antioxidante por ABTS<sup>+</sup> se realizó de acuerdo a la metodología de Yilmaz *et al.* (2015) y los extractos metanolicos 80% de lupino andino fueron preparados de acuerdo a la metodología de Martínez-Villaluenga *et al.* (2009), con modificaciones, tal como se explican a continuación: a la muestra se añadió una solución acuosa de metanol

80% (1:10; p/v), luego se agitó a 200 RPM por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Luego, se centrifugó a 1200 x g por 5 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada, posteriormente se recuperó el sobrenadante (extractos metanolicos 80% de lupino andino).

Por otro lado, en primer lugar, se preparó el catión ABTS<sup>+</sup> mezclando una solución acuosa de ABTS (78.4 mg de ABTS en 10 mL agua destilada) con una solución acuosa de persulfato de potasio (13.2 mg de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> en 10 mL de agua destilada) en la proporción de 1:1 (v/v) y dejándolo reaccionar en un lugar oscuro a temperatura ambiente por 16 horas. En segundo lugar, el catión ABTS<sup>+</sup> fue diluida con metanol al 80% hasta ajustar la absorbancia a  $1.1 \pm 0.02$  a 734 nm en un lector de micropozos (1 mL del catión ABTS<sup>+</sup> con 22 mL de metanol al 80%). Por último, 150 µL de extracto metanolicos 80% de lupino andino se mezclaron con 1350 µL de la solución diluida del catión ABTS<sup>+</sup>, luego se agitó en un vortex durante 10 segundos a 1200 RPM y posteriormente se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente en oscuridad durante 6 minutos. Luego, se puso 150 µL de la mezcla en el micropozo de la placa y luego se leyó la absorbancia a 734 nm en un lector de micropozos (PowerWave XS2 Biotek). Se usó metanol al 80% como blanco. La capacidad antioxidante fue calculada a partir de una curva estándar de Trolox (0.1 – 0.8 µmol TE/mL) y los resultados fueron expresados como µmol TE por gramo de muestra de lupino andino en base seca. La curva estándar de Trolox fue ensayado bajo las mismas condiciones para una muestra.

### **3.6.8 Determinación del contenido fenólico total (TPC)**

El análisis de compuestos fenólicos totales y los extractos metanolicos 80% de lupino andino fueron ensayados de acuerdo a la metodología de Yilmaz *et al.* (2015) con modificaciones, tal como se exponen a continuación: a la muestra de lupino andino se le añadió una solución acuosa de metanol al 80%, en la proporción de 1:10 (p/v), esta mezcla fue agitada a 200 RPM durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Luego, se centrifugó a 1200 x g por 5 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada, y posteriormente se recuperó el sobrenadante.

Por otro lado, se preparó el reactivo diluido Folin-Ciocalteu en agua destilada en la proporción de 1:10 (Folin-Ciocalteu:agua destilada, v/v); también se preparó una solución acuosa de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), adicionando 1 g de carbonato de sodio en 10 mL de solución en agitación constante. Se tomó 100 µL del extracto metanolicos 80% de lupino andino, 100 µL del reactivo diluido Folin-Ciocalteu, 100 µL de la solución acuosa de carbonato de sodio, y 1000 µL de agua destilada, luego se agitó la mezcla en un agitador por

15 segundos a 1200 RPM. Seguidamente, la mezcla se puso en un lugar oscuro por 30 minutos para que ocurra la reacción. Finalizado la reacción, se puso 130  $\mu$ L de la mezcla en el micropozo de la placa, luego se leyó la absorbancia a 726 nm en un lector de micropozos (PowerWave XS2 Biotek). El contenido fenólico total fue calculado a partir de una curva estándar de ácido gálico (0.001 – 0.010 mg AGE/mL) y los resultados fueron expresados como mg AGE por gramo de muestra de lupino andino en base seca. La curva estándar de ácido gálico fue ensayada bajo las mismas condiciones para una muestra.

### **3.6.9 Determinación de los tocoferoles**

La cuantificación de los tocoferoles se determinó mediante HPLC en fase normal, siguiendo la metodología trabajada por Hidalgo y Brandolini (2011) e Hidalgo *et al.* (2016), que a continuación se describe: 2 g de muestra se pesaron exactamente en un tubo con tapa rosca y se saponificó con nitrógeno durante 45 minutos a 70 °C, con la adición de 5 mL de pirogalol etanólico (60 g/L) como antioxidante, 2 mL de etanol (95%), 2 mL de cloruro de sodio (10 g/L) y 2 ml de hidróxido de potasio (600 g/L). Durante la saponificación, los tubos se agitaron en un Vórtex por 5-10 min. Posteriormente, se enfriaron en un baño de hielo y se añadieron 15 mL de cloruro de sodio (10 g/L). La suspensión se extrajo luego dos veces con 15 mL de hexano:acetato de etilo (9:1 v/v). La capa orgánica se recogió y se evaporó al vacío, seguido de un secado con nitrógeno; el residuo se disolvió en 2 mL de hexano:alcohol isopropílico (90:10 v/v) y se filtró a través de una membrana PTFE de 0.22  $\mu$ m (Diana Beck Scientific, Angera, Italia).

La solución filtrada (50  $\mu$ L) se inyectó en un sistema de HPLC que incluye: una columna Alltima SI, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m (Alltech Associates Inc; Deerfield, IL, EE. UU.); una columna de protección Alltima SI 7.5 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m (Alltech Associates Inc; Deerfield, IL, EE. UU.); fase móvil, hexano:acetato de etilo: ácido acético (97.3:1.8:0.9, v/v/v); velocidad de flujo, 1.6 mL/min; bomba L-2130 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón); detector fluorométrico Jasco 821 FP Intelligent Spectrofluorometer (Japón) a longitudes de onda de emisión de excitación de 290 nm y 330 nm, respectivamente; conectado a un integrador Hitachi D-7500 (Merck, Darmstadt, Alemania).

Las curvas estándar de los tocoles se construyeron utilizando 11 concentraciones diferentes (entre 0.40 y 109.73 mg/L) de estándar  $\alpha$ -tocoferol (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), 13 concentraciones diferentes (entre 0.38 y 72.20 mg/L) de estándar  $\beta$ -tocoferol (Supelco,

Bellefonte, PA, EE. UU.), 16 concentraciones diferentes (entre 0.20 y 23.20 mg/L) de estándar  $\gamma$ -tocoferol (Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.), 11 concentraciones diferentes (entre 0.05 y 9.35 mg/L) de estándar  $\delta$ -tocoferol (Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.), en hexano:2-propanol (90:10, v/v). Las concentraciones estándar de la solución madre se confirmaron espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de absorción conocido de cada compuesto.

A partir de las curvas de calibración, los límites de detección fueron calculados como el valor del intercepto de la línea de regresión más tres veces el error estándar de la estimación. Las curvas de calibración fueron lineales ( $r^2 = 1.00$ ;  $p \leq 0.001$ ) en los intervalos de concentración evaluados; los límites de detección fueron 0.39, 0.80, 0.52 y 0.31 mg/L, respectivamente, en la solución estándar. Todas las mediciones analíticas se realizaron dos veces. Los resultados se presentaron como medias, expresados en mg/kg en base seca o materia seca (MS).

#### **3.6.10 Determinación de los carotenoides**

La cuantificación de los carotenoides se determinó mediante HPLC en fase normal, siguiendo la metodología de Hidalgo *et al.* (2010), que a continuación se describe: 2 g de muestra se pesaron exactamente en un tubo con tapa rosca y se saponificaron bajo nitrógeno durante 45 minutos a 70 °C, con la adición de 5 mL de pirogalol etanólico (60 g/L) como antioxidante, 2 mL de etanol (95%), 2 mL de cloruro de sodio (10 g/L) y 2 mL de hidróxido de potasio (600 g/L). Durante la saponificación, los tubos se agitaron en un Vórtex por 5–10 min. Posteriormente, se enfriaron en un baño de hielo y se añadieron 15 mL de cloruro de sodio (10 g/L). La suspensión se extrajo luego dos veces con 15 mL de hexano:acetato de etilo (9:1, v/v). La capa orgánica se recogió y se evaporó al vacío, seguido de un secado con nitrógeno; el residuo se disolvió en 2 mL de hexano:alcohol isopropílico (90:10 v/v) y se filtró a través de una membrana PTFE de 0.22  $\mu$ m (Diana Beck Scientific, Angera, Italia).

La solución filtrada (20  $\mu$ L) se inyectó en el sistema de HPLC con las siguientes condiciones de operación: columna Alltima Si columna, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m (Alltech Associates Inc; Deerfield, IL, EE.UU.); Columna de protección Alltima SI 7.5 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m (Alltech Associates Inc; Deerfield, IL, EE. UU.); horno de columna a 20 °C, L-2300 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón); fase móvil, hexano:alcohol isopropílico (5%); caudal 1.5 mL/min; bomba L-2130 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japón). Los carotenoides fueron detectados

a 450 nm por un Detector de Arreglo de Diodos L2450 Elite LaChrom (Merck, Hitachi, Japón) dentro del rango de 200-650 nm. El sistema HPLC fue controlado por el software EZChrom Client/Server versión 3.1.7.

Para la cuantificación de los picos, se construyeron curvas de calibración utilizando 7 concentraciones diferentes (entre 0.3 y 3.0 mg/L) de la solución madre del estándar de luteína ( $\beta$ ,  $\epsilon$ -caroteno-3,30'diol; Fluka, St. Louis, MO, EE. UU.), 10 concentraciones diferentes (entre 0.05 y 1.03 mg/L) de la solución madre del estándar zeaxantina ( $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno-3,30'diol; Extrasynthese, Genay, Francia), diluido con alcohol isopropílico (10%) en hexano. Las soluciones madre estándar de luteína y zeaxantina se prepararon en etanol; sus concentraciones se confirmaron espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de absorción conocido de cada compuesto.

A partir de las curvas de calibración, los límites de detección fueron calculados como el valor del intercepto de la línea de regresión más 3 veces el error estándar de la estimación. Las curvas de calibración de luteína y zeaxantina fueron lineales ( $r^2 = 1.00$ ;  $p \leq 0.001$ ) en los rangos de concentración evaluados, y mostraron límites de detección en la solución estándar de 0.06 y 0.01 mg/L, respectivamente. Todas las mediciones analíticas se realizaron dos veces; los resultados se presentaron como medias, expresados en mg/kg en base seca o materia seca (MS).

### **3.7 DISEÑO EXPERIMENTAL**

En la figura 1, se muestran todas las operaciones y los análisis que se realizaron a los granos de lupino. De manera general, en la investigación se estudiaron dos factores: factor Genotipo “tres tipos de genotipos”: Altagracia, Andenes y Yunguyo; y factor Tratamiento “control + cuatro procesos tecnológicos”: lupino amargo (control), lupino desamargado, lupino extruido, lupino secado por aspersion con maltodextrina y lupino secado por aspersion con goma arábica.

### **3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados de los ensayos se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) considerando los tratamientos (amargo “muestra control”, desamargado, extruido, secado por aspersion con goma arábica y secado por aspersion con maltodextrina) y los genotipos (Altagracia, Andenes y Yunguyo) como factores y fueron expresados como valor medio  $\pm$  desviación

estándar. Cuando se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), se utilizó la prueba de rango múltiple de Tukey para discriminar entre los valores medios, en un nivel de significancia del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Minitab v. 17 (Minitab Inc, State College, PA, USA).

Modelo aditivo lineal del experimento:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + G_j + T_i \cdot G_j + e_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  : Respuesta correspondiente a la combinación de los factores  $T_i$  y  $G_j$ .

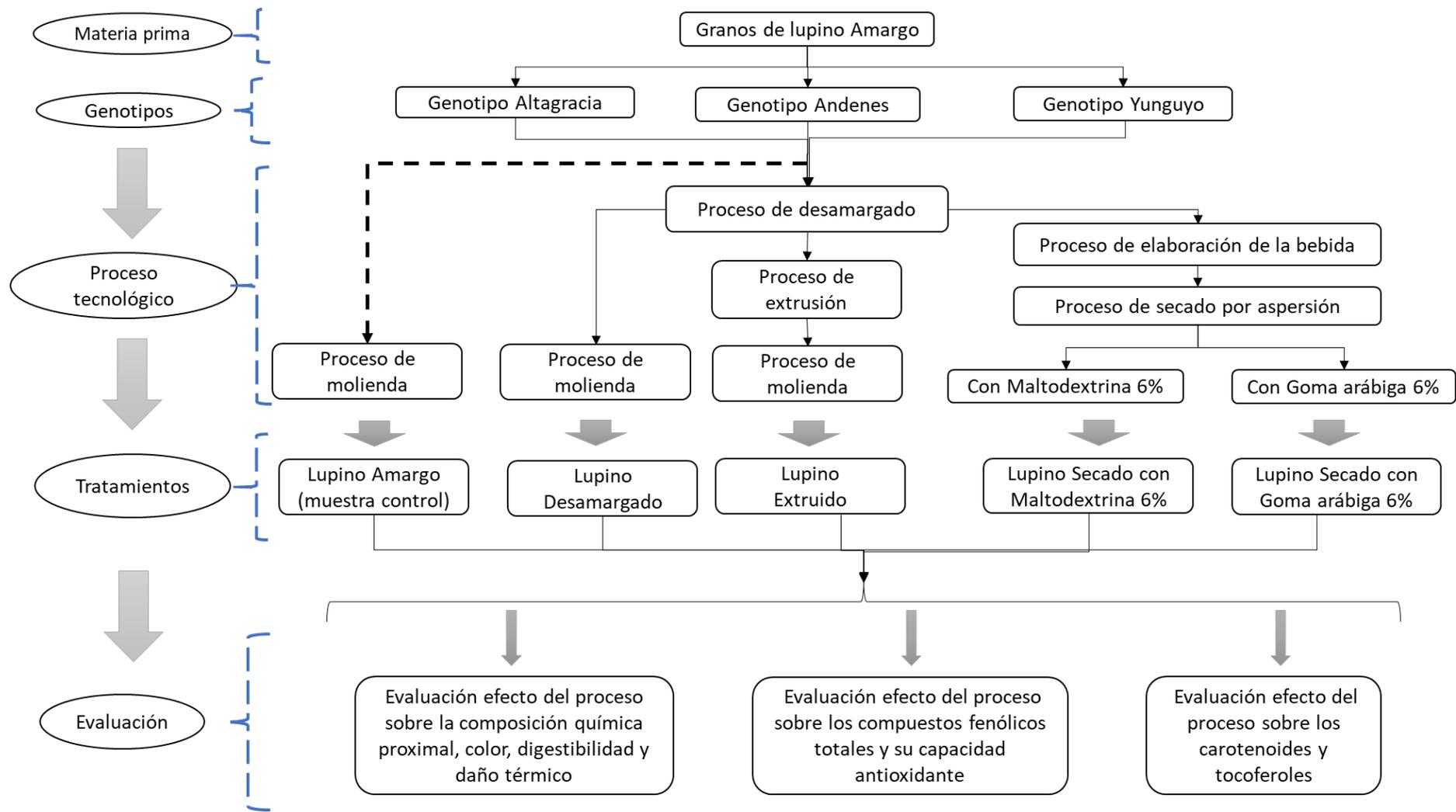
$\mu$  : Respuesta media global de todos los tratamientos.

$T_i$  : Factor tratamiento “Amargo (muestra control), desamargado, extrusión, secado por aspersión con goma arábica y secado por aspersión con maltodextrina”

$G_j$  : Factor Genotipo “Altagracia, Andenes y Yunguyo”

$T_i \cdot G_j$  : Interacción entre los factores  $T_i$  y  $G_j$ .

$e_{ij}$  : Error de los factores  $T_i$  y  $G_j$ .



**Figura 1: Esquema experimental general de la investigación**

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En toda esta sección, de acuerdo a los resultados del análisis de varianza, el factor tratamiento “*tipo de procesamiento*” presentó un efecto altamente significativo al igual que el factor genotipo, sin embargo la mayor variabilidad de los resultados sobre los componentes nutricionales y funcionales fue generado por el factor tratamiento; por tal razón, las Tablas mostraran solo los resultados medios de los tres genotipos para cada tratamiento (amargo “muestra control”, desamargado, extrusión, secado por aspersión con goma arábica y secado por aspersión con maltodextrina), mientras que en los Anexos se presentan una vista más detallada sobre los resultados de cada genotipo.

### **4.1 EFECTO DE LOS PROCESOS DE DESAMARGADO, EXTRUSIÓN Y SECADO POR ASPERSIÓN EN LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LAS PROTEÍNAS, LA COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL Y EL DAÑO TÉRMICO**

#### **4.1.1 Análisis de varianza para los procesos y genotipos**

El análisis de varianza (Tabla 1) mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos (tipos de procesamiento y control), entre genotipos (Altagracia, Andenes y Yunguyo) y su interacción para casi todas las características o parámetros analizados en las muestras; la excepción fue con el contenido de maltosa, modificado solo por los tratamientos. El efecto del tratamiento fue predominante (Anexo 1), explicando entre 72.4% ( $a^*$ ) y 100% (humedad) de la variación total; las diferencias entre genotipos representaron solo el 0.0 - 6.6%, mientras que la interacción a veces describió una porción considerable de variación, como para el caso de furosina (14.0%), glucosa (18.3%), fructosa (19.7%) y  $a^*$  (21.3%). Por lo tanto, para facilitar la presentación de los resultados de esta investigación, las Tablas informarán solo los resultados medios de cada tratamiento (proceso y control), mientras que en los Anexos se presentan una vista más detallada sobre los resultados de los diferentes genotipos bajo los diferentes tratamientos.

**Tabla 1. Media del cuadrado del análisis de la varianza para todos los tratamientos.**

	Tratamiento (T)	Genotipo (G)	T x G
Grados de libertad	4	2	8
Humedad	10806.60***	0.09***	0.43***
Lípidos	529.76***	59.12***	4.78***
Ceniza	21.15***	0.49***	0.32***
Proteínas	1000.00***	24.00***	40.27***
Carbohidratos	2192.95***	86.33***	57.22***
Digestibilidad de la proteína	278.05***	11.92***	1.72***
Fructosa	0.308***	0.056***	0.042***
Glucosa	0.131***	0.020***	0.016***
Maltosa	2.683***	0.006	0.005
Azucares reductores	3.724***	0.030***	0.033***
Sacarosa	22.14***	0.75***	0.70***
<i>L</i> *	450.34***	0.97***	4.04***
<i>a</i> *	3.12***	0.25***	0.46***
<i>b</i> *	476.88***	5.35***	6.39***
<i>a<sub>w</sub></i>	0.102***	0.001***	0.001***
Furosina	2317.81***	347.89***	204.12***
Hidroximetilfurfural	0.405***	0.003***	0.009***
Glucosilisomaltol	0.404***	0.004***	0.004***
Capacidad Antioxidante	8.84297***	0.3825***	0.3662***
Contenido de fenoles totales	0.8566***	0.07595***	0.0109***
Tocoles	18810.2***	11116.6***	768.3***
Carotenoides	0.389***	0.442***	0.019***

\*\*\*: Nivel de significancia a  $p \leq 0.001$

#### **4.1.2 Efecto del proceso en la digestibilidad *in vitro* de las proteínas y la composición química proximal**

##### **a. Desamargado de los granos lupino**

El lupino desamargado tuvo un mayor contenido de proteínas ( $54.4 \pm 2.61$  g/100 g de MS) que las semillas amargas (contenido de proteínas de  $47.4 \pm 2.80$  g/100 g de MS) (Tabla 2); Altagracia fue el genotipo con el mayor valor proteico ( $57.8$  g/100 g; Anexo 2). Se observó un aumento de proteínas, después del remojo y lavado, en diferentes especies de lupino; para el caso de *L. mutabilis* de 41.4 a 55.9 g/100 g (Carvajal-Larenas *et al.* 2014), mientras que en *L. albus* aumentó de 41.3 a 51.6 g/100 g (Erbas 2010). El contenido aumentado de proteínas es consecuencia de un cambio en la composición de la materia seca debido a la lixiviación de moléculas hidrosolubles (minerales, alcaloides, flavonoides, azúcares, almidón y otros oligosacáridos) y a algunas pérdidas de cáscara de los granos durante el proceso de desamargado.

El proceso de desamargado mejoró significativamente la digestibilidad *in vitro* de las proteínas (Tabla 2), que aumentó de 61.2% (harina amarga) a 63.7% (harina desamargada). El remojo y la cocción reducen la presencia de antinutrientes como el ácido fítico, los taninos, la  $\alpha$ -amilasa y los inhibidores de la tripsina; además, las etapas de calentamiento desnaturalizan las proteínas, haciéndolas más disponibles para la digestión (El-Hady y Habiba 2003).

El contenido de lípidos de los lupinos amargos ( $16.2 \pm 1.03$  g/100 g) fue similar a los resultados de *L. mutabilis* de Schoeneberger *et al.* (1982) y Gross *et al.* (1988), y es superior a *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius* (Bähr *et al.* 2014; Erbaş *et al.* 2005; Erbas 2010; Musco *et al.* 2017; Sujak *et al.* 2006). Este contenido de lípidos aumentó a 24.8 g/100 g después del proceso de desamargado; estos resultados concuerdan con Schoeneberger *et al.* (1982), quienes notaron un aumento del 15.0 al 26.9% después de cocinar y lavar durante tres días los granos de lupino andino.

**Tabla 2. Media ( $\pm$  desviación estándar) de la digestibilidad *in vitro* de proteínas (%) y composición química proximal (g/100 g de MS) de harinas crudas y procesadas de tres genotipos de lupinos andinos.**

	Digestibilidad	Proteínas	Lípidos	Ceniza	Carbohidratos <sup>1</sup>
Amargo	61.18 <sup>e</sup> $\pm$ 1.43	47.36 <sup>c</sup> $\pm$ 2.80	16.19 <sup>d</sup> $\pm$ 1.03	4.80 <sup>a</sup> $\pm$ 0.21	31.65 <sup>c</sup> $\pm$ 2.47
Desamargado	63.73 <sup>d</sup> $\pm$ 0.82	54.44 <sup>b</sup> $\pm$ 2.61	24.81 <sup>b</sup> $\pm$ 1.29	1.83 <sup>c</sup> $\pm$ 0.15	18.92 <sup>d</sup> $\pm$ 1.26
Extruido	68.06 <sup>c</sup> $\pm$ 1.21	55.69 <sup>a</sup> $\pm$ 2.03	24.82 <sup>b</sup> $\pm$ 2.29	1.68 <sup>d</sup> $\pm$ 0.34	17.81 <sup>e</sup> $\pm$ 1.37
Bebida secada por aspersión (goma arábica)	73.98 <sup>a</sup> $\pm$ 1.66	31.89 <sup>e</sup> $\pm$ 1.87	17.73 <sup>c</sup> $\pm$ 1.85	1.90 <sup>b</sup> $\pm$ 0.58	48.48 <sup>b</sup> $\pm$ 4.30
Bebida secada por aspersión (maltodextrina)	72.80 <sup>b</sup> $\pm$ 1.22	31.69 <sup>e</sup> $\pm$ 4.06	15.65 <sup>d</sup> $\pm$ 1.60	0.75 <sup>e</sup> $\pm$ 0.09	51.90 <sup>a</sup> $\pm$ 6.67

<sup>1</sup> Calculado por diferencia.

<sup>a-f</sup> Las medias con diferentes letras en superíndice en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

En *L. mutabilis*, los principales minerales solubles son Ca, P, Na y K (Marrou *et al.*; 2011). El contenido de cenizas de los lupinos amargos disminuyó de  $4.8 \pm 0.21$  g/100 g a 1.83 g/100 g después del proceso de desamargado (Tabla 2). El contenido de cenizas de los lupinos amargos fue casi similar a lo reportado por Carvajal-Larenas *et al.* (2014) y Carvajal-Larenas *et al.* (2016) para *L. mutabilis* de Ecuador (5.0 g/100 g DM); además nuestros resultados se encontraron dentro de rango (2.4 - 5.2 g/100 g DM) encontrado por estos autores. Asimismo, también estos autores encontraron una tendencia de disminución de cenizas (de 5.0 a 1.9 g/100 g) debido al proceso de desamargado. Mientras tanto, Erbas (2010) observaron una reducción más limitada (de 2.57 a 2.55 g / 100 g) en *L. albus*.

El contenido total de carbohidratos fue de  $31.7 \pm 2.5$  g/100 g en lupinos amargos, dentro del rango (26.1 - 43.2 g/100 g) observado por Carvajal-Larenas *et al.* (2016). El contenido total de carbohidratos fue modificado por el proceso de desamargado. El proceso de desamargado tuvo un efecto negativo en el contenido total de carbohidratos (incluida la fibra), que disminuyó de 31.6 a 18.9 g/100 g (Tabla 2), una disminución de casi el 40% de los valores de los granos amargos. Erbas (2010) observó que no hay muchos datos en la literatura sobre el comportamiento de los carbohidratos durante el proceso de desamargado, pero encontró una disminución de 17.4 a 14.1 g/100 g, en *L. albus*. Asimismo, el proceso de desamargado

eliminó por completo todos los azúcares que podrían estar implicados en reacciones de degradación, como Maillard y otros.

En la Tabla 3 y el Anexo 3 se reportan las concentraciones de los azúcares en los diferentes genotipos de lupino amargo; los azúcares reductores fueron escasos (0.86 g/100 g) y la sacarosa fue más abundante ( $4.34 \pm 1.33$  g/100 g). Sin embargo, la concentración de sacarosa estuvo por debajo de los valores encontrados por Gross *et al.* (1988) en dos genotipos de *L. mutabilis* chilenos de bajo alcaloide (9.0 - 9.9 g/100 g) obtenidos por fitomejoramiento, pero fue muy similar a las descritas por Erbaş *et al.* (2005) para *L. albus* (4.1 g/100 g para sacarosa).

**Tabla 3. Media ( $\pm$  desviación estándar) del contenido de azúcares (fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa, g/100 g de MS) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	Fructosa	Glucosa	Maltosa	Azúcares reductores	Sacarosa
Amargo	0.52 <sup>a</sup> $\pm$ 0.33	0.30 <sup>b</sup> $\pm$ 0.14	0.14 <sup>b</sup> $\pm$ 0.02	0.86 <sup>b</sup> $\pm$ 0.26	4.34 <sup>a</sup> $\pm$ 1.33
Desamargado	nd	nd	nd	nd	nd
Extruido	nd	nd	nd	nd	nd
Bebida secada por aspersión (goma arábica)	0.19 <sup>b</sup> $\pm$ 0.05	nd	nd	0.19 <sup>c</sup> $\pm$ 0.05	0.12 <sup>c</sup> $\pm$ 0.05
Bebida secada por aspersión (maltodextrina)	nd	0.32 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02	1.52 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12	1.84 <sup>a</sup> $\pm$ 0.11	0.13 <sup>b</sup> $\pm$ 0.00

Las medias con diferentes letras en superíndice en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).  
nd: no detectado.

### **b. Extrusión de la harina desamargada**

La extrusión rompe las estructuras de la pared celular y desencadena varios cambios químicos y reológicos; las nuevas interacciones hidrofóbicas, los enlaces de hidrógeno y disulfuro modifican profundamente el estado de agregación de proteínas (Chen *et al.* 2011). Uno de los problemas del proceso de extrusión es la pérdida de nutrientes durante la

extrusión de los alimentos. En la presente investigación fue posible ajustar los parámetros de extrusión (baja temperatura) para minimizar las pérdidas de lípidos. La concentración de proteína aumentó ligeramente de  $54.5 \pm 2.61$  a  $55.7 \pm 2.03$  g/100 g de MS (Tabla 2) en comparación con la harina desamargada, debido a una pérdida mínima de materia seca. Lampart-Szczapa *et al.* (2006) mostraron una disminución de las proteínas solubles entre harinas crudas y extruidas en tres especies de lupino (*L. luteus*, *L. albus* y *L. angustifolius*); según ellos, las proteínas cambian a estructura fibrosa después de la extrusión debido a la formación de nuevos enlaces. Además, Frías *et al.* (2011) observaron un ligero aumento de proteína de 23.6 a 24.1 g/100 g entre muestras de *Pisum sativum* crudas y extruidas, después de un proceso de extrusión a 129, 135 y 142 °C.

La extrusión mejoró significativamente la digestibilidad *in vitro* de las proteínas (Tabla 2), que aumentó de 63.7% (harina desamargada) a 68.1% (harina extruida); El-Hady y Habiba (2003) mencionaron que la temperatura de extrusión desnaturaliza las proteínas y reduce la presencia de antinutrientes, haciéndolas más disponibles para la digestión. De hecho, Palanisamy *et al.* (2018) descubrieron que la extrusión mejoró significativamente la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de los extruidos de lupino (80.9 - 85.9%) en comparación con las harinas crudas (78.2%) y concluyó que los principales factores que influyeron en fueron los cambios en la estructura de la proteína. El-Hady y Habiba (2003) notaron que la digestibilidad de proteínas *in vitro* aumentó de semillas crudas a semillas extruidas en habas (del 75.4% al 80.4%), guisantes (del 74.5% al 78.1%), garbanzos (del 74.0% al 81.1%) y frijoles (del 70.6% al 79.3%). La extrusión mejoró la digestibilidad del lupino, pero este nunca alcanzó el nivel del control, el aislado de proteína de caseína (87.1%).

El contenido de lípidos de la harina de lupino no cambió de desamargado a extruido (Tabla 2); sin embargo, Frías *et al.* (2011) en guisantes observaron aumentos moderados en la concentración de lípidos después de la extrusión. El contenido de cenizas mostró cambios marginales ( $1.8 - 1.7 \pm 0.34$  g/100 g), principalmente atribuibles al ecotipo Andenes. Modificaciones menores similares fueron observadas por El-Hady y Habiba (2003) en guisantes, garbanzos, frijoles y habas, así como por Frías *et al.* (2011) en guisantes. Por otro lado, la extrusión no cambió mucho el contenido de carbohidratos, que estuvo alrededor de los  $17.8 \pm 1.38$  g/100 g (Tabla 2). En guisantes la estabilidad de la concentración de carbohidratos después de la extrusión fue observada por Frías *et al.* (2011). Los azúcares no

fueron detectados en muestras extruidas (Tabla 3), debido a que estos fueron previamente eliminados mediante el proceso de desamargado.

### **c. Secado por aspersión de la bebida de lupino**

Al principio, la bebida de lupino (8.5% de sólidos totales), preparada en esta investigación como material de entrada para el proceso de secado por aspersión, tenía la siguiente composición química proximal:  $45.28 \pm 4.28$  g/100 g de proteínas,  $35.69 \pm 3.01$  g/100 g de lípidos,  $18.52 \pm 5.94$  g/100 g de carbohidratos y  $0.51 \pm 0.07$  g/100 g de cenizas en MS. Por lo tanto, la bebida de lupino tenía un contenido de proteínas ( $45.28 \pm 4.28$  g/100 g) significativamente menor que las harinas amargas, desamargadas y extruidas, porque el tamiz de tela filtra (retiene) muchos sólidos que probablemente contienen agregados de proteínas complejas, permitiendo solo el paso de proteínas solubles. La bebida de lupino experimentó un aumento en la concentración de lípidos (promedio:  $35.7 \pm 3.01$  g/100 g), debido a la eliminación de compuestos sólidos por el tamizado, pero también un contenido muy bajo de cenizas ( $0.5 \pm 0.07$  g/100 g). Jiménez *et al.* (2000), en una bebida de *L. campestris*, observaron un contenido de proteínas de 4.8 g/100 g y un contenido de lípidos de 1.4 g/100 en una solución de sólidos totales del 11% (correspondiente a 43.6 g/100 g y 12.7 g/100 g, expresado en materia seca, respectivamente), lo que indica una baja densidad de nutrientes en comparación con *L. mutabilis*. Además, los sólidos eliminados durante la preparación de la bebida de lupino podrían utilizarse para la preparación de nuevos productos de valor nutricional, como propuesto para otros cultivos leguminosos (por ejemplo, soja; McClement *et al.* 2019). La concentración de carbohidratos fue de alrededor de  $18.5 \pm 5.94$  g/100 g; sin embargo, el genotipo Altagracia mostró valores más altos que los otros dos genotipos de lupinos (Anexo 2). La concentración de azúcares en la bebida de lupino no fue medida, porque ya estaban por debajo de los límites de detección en los granos de lupino desamargados.

Después del secado por aspersión, la bebida secada (lupino en polvo) obtenida mostró un contenido de proteína (31.7-31.9 g/100 g de MS) inferior a las harinas obtenidas por los otros procesos estudiados. Este contenido fue similar cuando se utilizaron diferentes agentes encapsulantes (materiales de pared), como goma arábiga o maltodextrina, durante el secado por aspersión (Tabla 2). La presencia de los agentes encapsulantes (6%), que tienen un contenido proteico muy pobre/nulo, tuvo un efecto diluyente sobre el contenido proteico.

La digestibilidad *in vitro* de proteínas del lupino en polvo fue del 74.0% con goma arábica y del 72.8% con maltodextrina; todos los genotipos mostraron comportamientos similares. Por lo tanto, el secado por aspersión aumentó significativamente la digestibilidad *in vitro* de las proteínas en comparación a la harina desamargada (63.7%), aunque no llegó al nivel del aislado de proteína de caseína (control; 87.1%). Del mismo modo, Almeida *et al.* (2015) reportaron una digestibilidad *in vitro* de proteínas de la soya en polvo (55.2%) mucho más baja que la caseína en polvo (83.7%). El valor nutritivo de las proteínas de las leguminosas es inferior a las proteínas animales debido a menor digestibilidad, deficiencia de aminoácidos ricos en azufre y presencia de factores antinutricionales.

La concentración de lípidos también fue baja (15.7-17.7 g/100 g de MS), es decir aproximadamente la mitad de la bebida de lupino, e inferior a los demás tratamientos; la adición de goma arábica durante el proceso de secado por aspersión conservó un contenido de lípidos marginalmente alto en comparación con la maltodextrina.

La adición de agentes encapsulantes durante el secado por aspersión contribuyó a un ligero aumento en el contenido de cenizas en comparación con la bebida de lupino para la maltodextrina añadida (de 0.51 a 0.75 g/100 g de MS) y cuatro veces mayor para la goma arábica añadida (de 0.51 a 1.90 g/100 g de MS) (Tabla 2), por el mayor contenido de cenizas que tiene la goma arábica (~2%) en comparación con la maltodextrina (~0.45%). El genotipo Altagracia con goma arábica tenía una concentración de cenizas que fue la mitad de los otros dos genotipos (Anexo 2). Del mismo modo, los agentes encapsulantes contribuyeron al aumento en el contenido de carbohidratos, alcanzando 48.48 g/100 g (muestras con goma arábica) y 51.90 g/100 g (muestras con maltodextrina). La presencia de azúcares en el lupino en polvo (ausentes en la bebida de lupino) se debió totalmente a los agentes encapsulantes: en particular, la goma arábica suministró fructosa y sacarosa, mientras que la maltodextrina aportó glucosa, maltosa y sacarosa (Tabla 3).

#### **4.1.3 Efecto del proceso en los marcadores de daño térmico**

##### **a. Color y actividad de agua**

Las  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  del lupino amargo (Tabla 4) fueron  $84.6 \pm 0.90$ ,  $-2.10 \pm 0.44$  y  $20.3 \pm 1.55$ , respectivamente, lo que indica un tono amarillo verdoso pálido. No hay mucha información disponible sobre el color del lupino, pero Mohamed y Rayas-Duarte (1995) registraron 82.8 ( $L^*$ ), -1.98 ( $a^*$ ) y +21.3 ( $b^*$ ), mientras que Yorgancilar y Bilgiçli (2014) observaron, en *L.*

*albus*, valores para  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  dentro del rango de 65.2 - 67.1, 3.4 - 7.0 y 16.5 - 20.3, respectivamente. En *L. angustifolius*, Rumiyati *et al.* (2015) observaron para  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  valores de 90.6, -1.3 y 28.5, respectivamente.

El proceso de desamargado, condujo a una ligera variación en los parámetros de color en comparación con el lupino amargo, con  $\Delta E = 5.03 \pm 1.32$  (Tabla 4), posiblemente como resultado de las operaciones de hidratación y cocción aplicadas para eliminar los alcaloides y que a su vez también terminaron eliminando algunos pigmentos. La extrusión ( $\Delta E = 10.50 \pm 3.25$ ) redujo la luminosidad ( $75.1 \pm 1.72$ ) y aumentó  $a^*$  ( $-0.94 \pm 0.48$ ) y  $b^*$  ( $23.8 \pm 1.90$ ). Rumiyati *et al.* (2015) mencionaron que la alta temperatura de extrusión influye en el color del lupino. El lupino en polvo con maltodextrina fue el más diferente en cuanto al color ( $\Delta E = 15.24 \pm 1.03$ ) seguido del polvo con goma arábica ( $\Delta E = 14.56 \pm 1.05$ ). Esas diferencias se deben principalmente a la luminosidad de los lupinos en polvo, que fue superior (92.0 - 92.6) a los demás lupinos procesados, mientras que  $b^*$  fue menor (7.7 - 7.8): los agentes encapsulantes mejoraron la luminosidad, pero la maltodextrina aumentó  $L^*$  más que la goma arábica.

**Tabla 4. Media ( $\pm$  desviación estándar) de las coordenadas de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), diferencia de color ( $\Delta E$ ) y la actividad del agua ( $a_w$ ) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$a_w$	$\Delta E$
Amargo	84.59 <sup>d</sup> $\pm$ 0.90	-2.10 <sup>b</sup> $\pm$ 0.44	20.32 <sup>b</sup> $\pm$ 1.55	0.57 <sup>b</sup> $\pm$ 0.01	-
Desamargado	85.47 <sup>c</sup> $\pm$ 0.51	-2.11 <sup>b</sup> $\pm$ 0.18	15.41 <sup>c</sup> $\pm$ 0.28	0.58 <sup>b</sup> $\pm$ 0.01	5.03 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>
Extruido	75.09 <sup>e</sup> $\pm$ 1.72	-0.94 <sup>a</sup> $\pm$ 0.48	23.82 <sup>a</sup> $\pm$ 1.90	0.71 <sup>a</sup> $\pm$ 0.03	10.50 $\pm$ 3.25 <sup>ab</sup>
Bebida secada por aspersión (goma arábica)	91.99 <sup>b</sup> $\pm$ 0.32	-2.22 <sup>b</sup> $\pm$ 0.33	7.80 <sup>d</sup> $\pm$ 1.13	0.40 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02	14.56 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>
Bebida secada por aspersión (maltodextrina)	92.56 <sup>a</sup> $\pm$ 0.79	-2.46 <sup>c</sup> $\pm$ 0.17	7.67 <sup>d</sup> $\pm$ 1.03	0.41 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02	15.24 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>

Las medias con diferentes letras en superíndice en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

La actividad del agua ( $a_w$ ) de las muestras amargas y desamargadas fue muy similar ( $0.57 \pm 0.01$  y  $0.58 \pm 0.01$ , respectivamente) y dentro del rango para la harina de soya (0.55 - 0.66)

reportado por Paucar-Menacho *et al.* (2010). La extrusión aumentó la  $a_w$  ( $0.71 \pm 0.03$ ); la actividad de agua más baja se reportó en las muestras secadas por aspersión (goma arábica:  $0.40 \pm 0.02$  y maltodextrina:  $0.41 \pm 0.02$ ). Un aumento en la actividad del agua ( $a_w$  del lupino amargo y desamargado) favorece la reacción de Maillard y en consecuencia el desarrollo del color marrón, pero después de que la actividad de agua alcanza alrededor de 0.7 ( $a_w$  del lupino extruido) las tasas de oscurecimiento disminuyen.

#### **b. Furosina, HMF y GLI**

La furosina fue el marcador más sensible de daño térmico para el caso del lupino andino. En general, el daño térmico de las muestras fue mínimo (Tabla 5). El contenido de furosina fue bajo en lupinos amargos, desamargados y extruidos (8.7 – 10.5 mg/100 g de proteína), aumentó ligeramente después del secado por aspersión con goma arábica ( $13.4 \pm 2.0$  mg/100 g de proteína) y mostró un marcado aumento ( $54.1 \pm 20.7$  mg/100 g de proteína) después del secado por aspersión con maltodextrina. En particular, la presencia de furosina fue abundante en el genotipo Andenes, que alcanzó 80.5 mg/100 g de proteína (Anexo 5); el contenido de azúcares reductores fue similar entre los genotipos (Anexo 3), por lo tanto, la mayor formación de furosina en este genotipo (Andenes) puede estar relacionada con un contenido diferente de  $\epsilon$ -aminoácidos. Estos valores son comparables a los reportados por Arnoldi *et al.* (2007) (25.7 - 53.6 mg/100 g de proteína) para aislados de proteína de lupino secado por aspersión, y muy por debajo de los 200 - 1000 mg/100 g de proteína reportados para diez fórmulas infantiles (Rufián-Henares *et al.* 2008). La furosina es un indicador final de los cambios de calidad asociados a la reacción de Maillard (Rufián-Henares *et al.* 2008). Por otro lado, HMF y GLI, indicadores de daño térmico que monitorizan el daño térmico durante los pasos intermedios avanzados de la reacción de Maillard, se encontraron por debajo del límite de detección en las harinas amargas, desamargadas y extruidas. El secado por aspersión condujo a un contenido de HMF bajo pero detectable en las muestras con goma arábica ( $0.11 \pm 0.09$  mg/kg); la goma arábica no tiene maltosa; por lo tanto, no se observó GLI. En muestras secadas por aspersión con maltodextrina se detectó una mayor concentración de HMF ( $0.60 \pm 0.09$  mg/kg), junto con la presencia de GLI ( $0.58 \pm 0.00$  mg/kg), lo que indica que este agente encapsulante (maltodextrina, un complejo de oligosacáridos rico en monómeros de glucosa) estuvo involucrado en un daño térmico más fuerte (pero a pesar de eso su contenido es mínimo).

**Tabla 5. Media ( $\pm$  desviación estándar) de los índices de daño térmico (furosina, mg/100 g de proteína; hidroximetilfurfural, HMF, mg/kg MS; y glucosilisomaltol, GLI, mg/kg MS) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	Furosina	HMF	GLI
Amargo	8.87 <sup>cd</sup> $\pm$ 5.10	Nd	nd
Desamargado	10.52 <sup>c</sup> $\pm$ 2.84	Nd	nd
Extruido	8.71 <sup>d</sup> $\pm$ 2.42	Nd	nd
Bebida secada por aspersión (goma arábica)	13.39 <sup>b</sup> $\pm$ 1.99	0.11 <sup>b</sup> $\pm$ 0.09	nd
Bebida secada por aspersión (maltodextrina)	54.11 <sup>a</sup> $\pm$ 20.68	0.60 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.0

Las medias con diferentes letras en superíndice en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

nd: no detectado.

#### **4.2 EFECTO DE LOS PROCESOS DE DESAMARGADO, EXTRUSIÓN Y SECADO POR ASPERSIÓN EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES**

En general, los valores obtenidos de capacidad antioxidante del lupino andino amargo por DPPH (5.09 – 5.62  $\mu\text{mol trolox/g b.s.}$ ) y ABTS<sup>+</sup> (146.72 – 167.87  $\mu\text{mol trolox/g b.s.}$ ) fueron diferentes para cada tipo de genotipo (Anexo 6); estos valores se encuentran por encima de los resultados obtenidos por Martínez-Villaluenga *et al.* (2009), quienes encontraron valores dentro de los rangos de 2.83 – 3.09 y 47.0 – 71.4  $\mu\text{mol trolox/g b.s.}$  respectivamente, en diferentes semillas crudas de genotipos de *L. angustifolius* y *L. albus*. Adicionalmente, Ranilla *et al.* (2009) encontraron valores de 0.82 – 1.6  $\mu\text{mol trolox/g b.h.}$  de capacidad antioxidante por DPPH en cotiledones de diferentes genotipos de *L. mutabilis*. Además, en diferentes genotipos de *L. albus*, la capacidad antioxidante por ABTS<sup>+</sup> fue de 53 – 123  $\mu\text{mol trolox/g b.s.}$  (Karamac *et al.* 2018). El contenido de fenoles totales (1.33 – 1.53 mg AGE/g

b.s.) de lupino andino amargo, se encuentran por debajo de lo reportado por Martínez-Villaluenga *et al.* (2009), quienes encontraron valores de 1.82 – 2.53 mg ácido ferúlico/g b.s, en diferentes semillas crudas de genotipos de *L. angustifolius* y *L. albus*. Sin embargo, nuestros resultados están por encima de los resultados de compuestos fenólicos obtenidos por Jiménez-Martínez *et al.* (2007), quienes hallaron 5.8 mg ácido tánico/kg de semillas, en muestras de *L. mutabilis*. Ranilla *et al.* (2009) reportaron valores dentro del rango de 9.67 – 11.35 mg catequina/g b.h. para diferentes genotipos de *Lupinus mutabilis*. Karamać *et al.* (2018) encontraron valores de 4.36 – 7.24 mg AGE/g b.s. en diferentes genotipos de *L. albus*. Estas variantes de resultados entre muestras pueden probablemente deberse al método de extracción y cuantificación de estos compuestos fenólicos con actividad antioxidante.

**Tabla 6. Media ( $\pm$  desviación estándar) de la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS<sup>+</sup>) y del contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	DPPH		ABTS <sup>+</sup>		TPC	
	( $\mu$ mol Trolox/g b.s.)		( $\mu$ mol Trolox/g b.s.)		(mg AGE/g b.s.)	
	SD	D	SD	D	SD	D
Amargo	5.25 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09	5.57 <sup>a</sup> $\pm$ 0.10	150.11 <sup>a</sup> $\pm$ 0.2	163.3 <sup>a</sup> $\pm$ 0.78	1.36 <sup>a</sup> $\pm$ 0.03	1.51 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04
Desamargado	4.06 <sup>b</sup> $\pm$ 0.12	4.47 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12	74.22 <sup>b</sup> $\pm$ 0.32	75.79 <sup>b</sup> $\pm$ 1.00	1.04 <sup>b</sup> $\pm$ 0.01	1.20 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01
Extruido	4.10 <sup>b</sup> $\pm$ 0.08	4.73 <sup>a</sup> $\pm$ 0.15	75.56 <sup>b</sup> $\pm$ 0.94	76.88 <sup>b</sup> $\pm$ 1.12	1.10 <sup>b</sup> $\pm$ 0.01	1.33 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02
Bebida secada por aspersión (goma arábica)	2.87 <sup>c</sup> $\pm$ 0.09	3.15 <sup>b</sup> $\pm$ 0.04	52.10 <sup>c</sup> $\pm$ 0.90	62.42 <sup>c</sup> $\pm$ 1.33	0.66 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02	0.75 <sup>b</sup> $\pm$ 0.01
Bebida secada por aspersión (maltodextrina)	2.90 <sup>c</sup> $\pm$ 0.05	3.12 <sup>b</sup> $\pm$ 0.06	50.65 <sup>c</sup> $\pm$ 0.68	61.63 <sup>c</sup> $\pm$ 0.83	0.64 <sup>c</sup> $\pm$ 0.01	0.76 <sup>b</sup> $\pm$ 0.02

Las medias con diferentes letras en superíndice en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

b.s.: Base seca

SD: Sin desengrasar

D: Desengrasadas

Después del proceso de desamargado, los valores de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos del lupino amargo se redujeron (Tabla 6); esto probablemente se debió a la temperatura de cocción y los lavados sucesivos que se realizaron a los granos de lupino

durante este proceso. Esta tendencia también fue observado por Tsaliki *et al.* (1999), quienes mencionaron que durante el desamargado, por lavados sucesivos, la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles de *L. albus* disminuyen. Adicionalmente, Jiménez-Martínez *et al.* (2007), mencionaron que el contenido de los compuestos bioactivos (como compuestos fenólicos y antioxidantes) del lupino se reducen durante el proceso de desamargado, debido a que algunos antioxidantes son solubles en agua e inestables a temperaturas de cocción.

La extrusión es un proceso rápido y el tiempo de permanencia del lupino desamargado dentro de las secciones del extrusor fue cortos, en promedio 1 – 2 minutos. Por otro lado, la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles de las muestras de lupino desamargadas y extruidas fueron muy similares y sin diferencias significativas entre ellas ( $p \geq 0.05$ ) (Tabla 6), esta similitud probablemente se debió a que las temperaturas (95 – 140 °C) no fueron muy lesivas para estos compuestos bioactivos; además, el lupino tiene altos niveles de proteínas en su composición química, que probablemente actuaron como un amortiguador y evitó la degradación de los antioxidantes. Por el contrario, Anton *et al.* (2009) reportaron una ligera disminución de los componentes fenólicos durante la extrusión; cabe indicar que estos investigadores realizaron el proceso de extrusión a 160 °C y trabajaron con frijol. El frijol no tiene altos niveles de proteína como el lupino y probablemente esto ocasionó que los fenólicos fueran más inestables. Por otro lado, Brennan *et al.* (2011), mencionaron que el proceso de extrusión puede ocasionar un ligero aumento de componentes fenólicos en el alimento extruido, probablemente producto de la degradación de algunos aminoácidos durante la extrusión; este enunciado concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación.

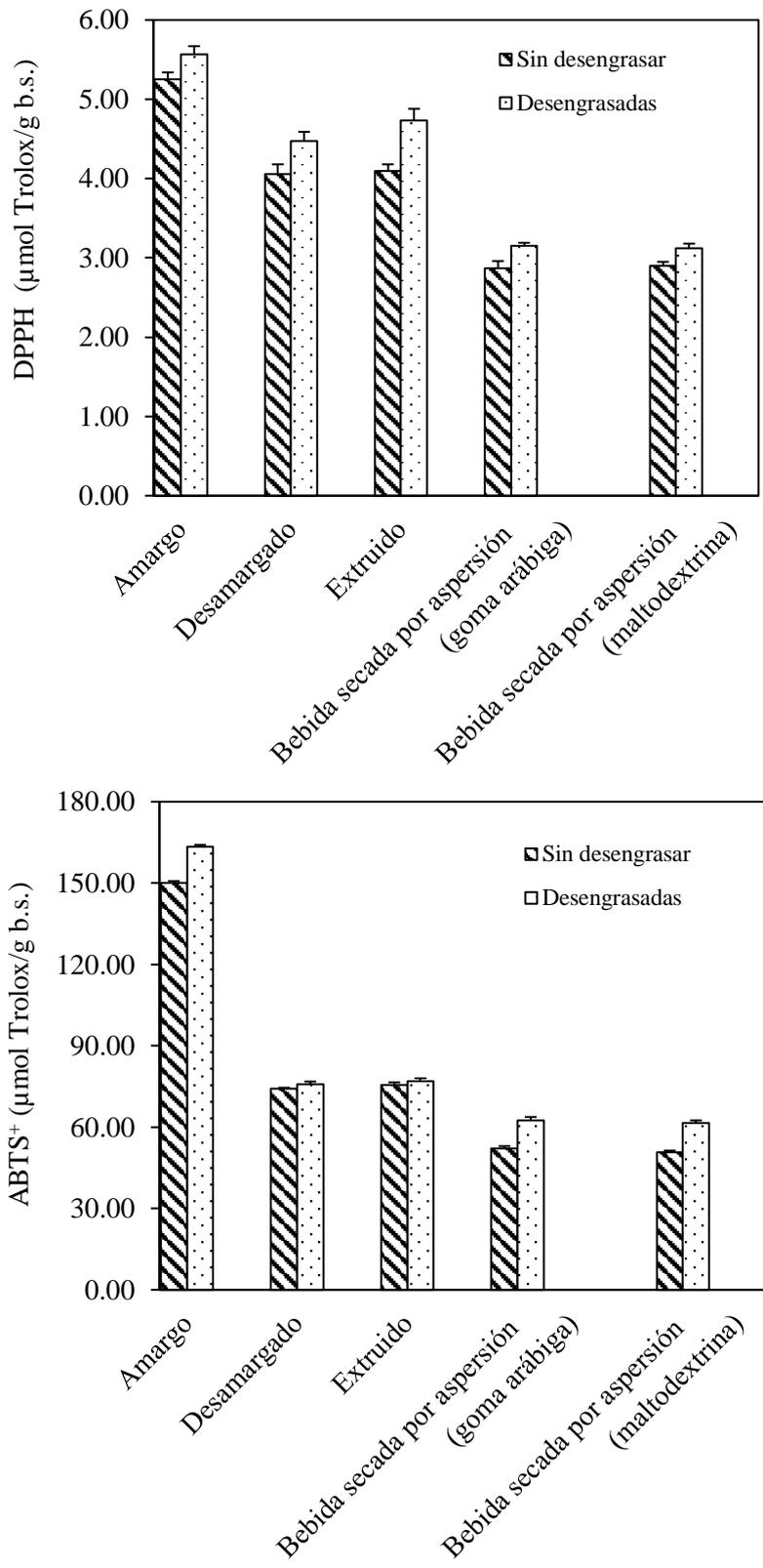
El proceso de secado por aspersion trabaja a altas temperaturas y seca al alimento en un corto tiempo. Este proceso tiene muchas ventajas, como prolongar la vida útil del alimento y preservar componentes bioactivos (Zhang *et al.* 2020; Lim *et al.* 2011). En la presente investigación, el proceso de secado por aspersion se realizó a 170 °C y modificó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales del lupino desamargado (Tabla 6). Por consiguiente, la capacidad antioxidante se redujo significativamente, probablemente debido a la forma de preparación de la bebida de lupino y a la temperatura elevada de secado. Lim *et al.* (2011) mencionan que el proceso de secado por aspersion puede ocasionar una ligera reducción de los compuestos antioxidantes que tiene el alimento, debido a la temperatura y a las condiciones de secado. No existe

información puntual sobre valores de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de *L. mutabilis* secado por aspersión para poder comparar nuestros resultados. Zarei *et al.* (2019) demostraron que a mayor tiempo de tratamiento térmico se reduce más el contenido fenólico. El tipo de agente encapsulante (goma arábica o maltodextrina) usado en el proceso de secado por aspersión no afectó significativamente ( $p \geq 0.05$ ) la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales. Además, las muestras de lupino Andino encapsuladas con goma arábica tuvieron una mayor capacidad antioxidante que las encapsuladas con maltodextrina. Según nuestros resultados, la goma arábica protegió a los antioxidantes de la degradación durante el proceso de secado por aspersión, de manera más eficiente que la maltodextrina. Zhang *et al.* (2020) obtuvieron similares resultados en muestras de fruta encapsuladas con goma arábica y maltodextrina.

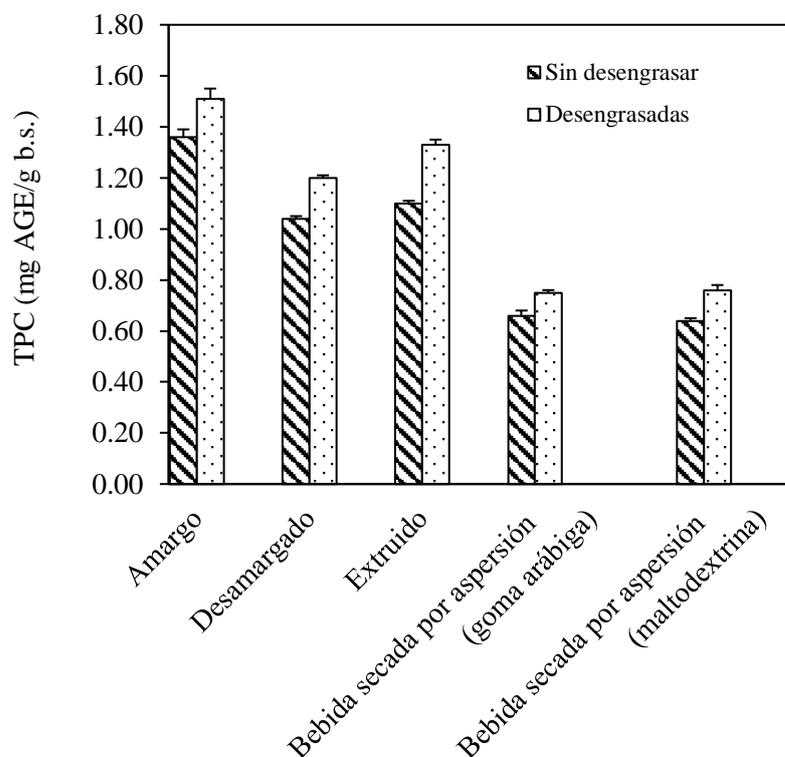
En cuanto a las grasas, los lupinos tienen altos contenidos de lípidos (Gross *et al.* 1988; Thambiraj *et al.* 2018); por tal razón, las muestras de lupinos fueron desengrasadas con el fin de comparar el contenido de compuestos bioactivos (antioxidantes y compuestos fenólicos) entre muestras procesadas sin desengrasar (muestras integrales) y desengrasadas. De la Tabla 6 se puede apreciar que todas las muestras desengrasadas (control y procesadas) tuvieron más cantidad de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante que las muestras sin desengrasar. En términos generales, no hay suficiente información sobre el efecto de la grasa en la cuantificación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales, en el lupino procesado. Por otro lado, Cano y Arnao (2004) mencionaron que los antioxidantes son compuestos químicos de naturaleza hidrosoluble y liposoluble; además estos investigadores encontraron en muestras de zumos de naranjas comerciales, que más del 98% de la actividad antioxidante es debido a los antioxidantes hidrosolubles; esos hallazgos podrían explicar del porque nuestros resultados de capacidad antioxidante fueron más altos en muestras desengrasadas que en muestras sin desengrasar. Similares resultados fueron obtenidos por Castro *et al.* (2016), quienes encontraron valores más altos de capacidad antioxidante y contenido de polifenoles en muestras de granos de cacao desengrasados que en muestras sin desengrasar.

En general, el proceso tecnológico (desamargado, extruido y secado por aspersión) tuvo un efecto negativo sobre el contenido de compuestos químicos antioxidantes importantes para la salud, disminuyéndolos en contenido (Figuras 2 y 3). Sun *et al.* (2019) observaron similar fenómeno en sus resultados de investigación. Dichos autores evaluaron el efecto del

tratamiento térmico sobre los antioxidantes de *Chenopodium formosanum* Koidz, e indicaron que el tratamiento térmico convencional, como la cocción y pasteurización, afectan negativamente a los antioxidantes. Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes (Plank *et al.* 2012), por tal razón, en esta investigación se encontró una relación proporcional entre los compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante para el *L. mutabilis*; menor cantidad de compuestos fenólicos brinda una menor capacidad antioxidante. Por lo tanto, el contenido de fenólicos del lupino Andino depende del proceso tecnológico, tal como lo mencionaron Dueñas *et al.* (2009) y Liu *et al.* (2019). Similares resultados obtuvieron Mohammed *et al.* (2017), quienes describieron que el proceso de germinación, fermentación, cocción y desamargado genera cambios en la composición nutricional y fitoquímica de *Lupinus albus*. De la Tabla 7, la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales de las muestras de lupino amargo disminuyeron dentro de los rangos de 36.61 – 36.67 y 20.53 – 23.53%, respectivamente, durante el proceso de desamargado. El proceso de extrusión no provocó pérdida de capacidad antioxidante, ni de compuestos fenólicos totales. El proceso de secado por aspersión ocasionó una ligera reducción de capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales.



**Figura 2. Promedio de la capacidad antioxidante por DPPH y ABTS<sup>+</sup> de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**



**Figura 3. Promedio de los compuestos fenólicos totales (TPC) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

Además, de la Tabla 7 se puede observar que se perdieron más compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en muestras de bebida secada por aspersión con maltodextrina en comparación a las muestras con goma arábica; estos resultados evidentemente muestran que la maltodextrina protege menos que la goma arábica. Los resultados obtenidos en la presente investigación también fueron observados por Martínez-Villaluenga *et al.* (2009), quienes observaron una elevada disminución de 38 – 73% de la capacidad antioxidante por el radical ABTS<sup>+</sup>, de 38 - 82% por DPPH y de 38 – 56% por TPC en diversas muestras de harinas de *L. angustifolius* y *L. albus* con bajos contenidos de  $\alpha$ -galactosida.

**Tabla 7. Porcentaje (%) de reducción del promedio de la capacidad antioxidante y del contenido de fenoles totales (TPC) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	Capacidad antioxidante		TPC	
	Sin desengrasar	Desengrasadas	Sin desengrasar	Desengrasadas
Proceso de desamargado	36.61	36.67	23.53	20.53
Proceso de extrusion	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.
Proceso de elaboración de la bebida secada por aspersion (goma arábica)	29.56	23.59	36.54	37.50
Proceso de elaboración de la bebida secada por aspersion (maltodextrina)	30.16	24.44	38.46	36.67

N.P.: no presentó reducción de capacidad antioxidante y TPC.

### **4.3 EFECTO DE LOS PROCESOS DE DESAMARGADO, EXTRUSIÓN Y SECADO POR ASPERSIÓN EN LOS TOCOFEROLES Y CAROTENOIDES**

#### **4.3.1 Efecto del proceso en los tocoferoles**

Los tocoferoles se han investigado más en los aceites comestibles, como por ejemplo en el aceite de linaza (Dąbrowski *et al.* 2019), y muy poco en las harinas de leguminosas. En la Tabla 8 se muestra el contenido de los tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol) en diferentes muestras de lupino Andino procesado, siendo  $\gamma$ -tocoferol el mayor componente presente en el lupino. El contenido de  $\gamma$ -tocoferol presente en la harina de lupino amargo fue mayor en comparación con diferentes genotipos de semillas de cebada (Cavallero *et al.* 2004) y trigo espelta (Skrajda-Brdak *et al.* 2019). Sin embargo, el contenido de  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -tocoferol en harina de lupino amargo fue menor en comparación con el trigo espelta (Skrajda-Brdak *et al.* 2019). El genotipo influye en el contenido de tocoferoles (Anexo 7), siendo el genotipo Yunguyo el que presentó más  $\alpha$ -tocoferol, mientras Altagracia tuvo más  $\delta$ -tocoferol en, independientemente del proceso tecnológico. Estas variaciones demuestran que las concentraciones de estos compuestos están en función al tipo de alimentos y sus genotipos; asimismo Jung *et al.* (2017) demostraron esa correlación.

El proceso de desamargado hizo que se modificaran los contenidos de  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol, evidenciándose un ligero incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ); en cambio,  $\delta$ -tocoferol no varió significativamente; estos cambios de contenidos probablemente se debieron a la variación de la materia seca después del desamargado. El proceso de extrusión no afectó significativamente el contenido de tocoferoles presentes en el lupino desamargado. Jung *et al.* (2017) señalaron que las concentraciones de tocoferoles disminuyen cuando existe una oxidación lipídica; en tal sentido, de los resultados de nuestra investigación se puede inferir que durante el proceso de extrusión no ocurrió una oxidación lipídica severa, y por ende el contenido de tocoferoles en el lupino extruido no se redujo de manera significativa.

El proceso de secado por aspersión tuvo un efecto significativo sobre el contenido de  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol, disminuyéndolos. No existe suficiente información sobre el efecto del proceso sobre los tocoferoles en leguminosas. El contenido de los tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol) fueron menores en la bebida de lupino secada por aspersión en comparación con las otras muestras de lupino procesado (desamargado y extruido). Similar efecto fueron observados por Giambanelli *et al.* (2020), quienes reportaron un 15 - 30% de pérdida de tocoferoles durante la preparación (tiempos largos de cocción y secado) de un producto a base de escaña. El tipo de agente encapsulante usado en el secado por aspersión no influyó significativamente sobre el contenido de tocoferoles, aunque las muestras de lupino con maltodextrina tuvieron valores ligeramente más altos que las muestras con goma arábiga: Estos resultados de tocoferoles fueron muy inferiores a los resultados obtenidos por Hidalgo *et al.* (2019) en galletas de agua enriquecidas con trigo y cebada, además estos autores mencionaron que el proceso de horneado degrada algunos componentes antioxidantes, y probablemente el proceso de secado por aspersión también degradó alguno de estos compuestos.

**Tabla 8. Media ( $\pm$  desviación estándar) del contenido de tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol, mg/kg MS) y carotenoides (luteína y zeaxantina, mg/kg MS) de las harinas de tres genotipos de lupino Andino.**

	$\alpha$ - tocoferol	$\beta$ - tocoferol	$\gamma$ - tocoferol	$\delta$ - tocoferol	Luteína	Zeaxantina
Amargo	0.56 <sup>b</sup> $\pm$ 0.06	1.23 <sup>c</sup> $\pm$ 0.39	225.61 <sup>b</sup> $\pm$ 6.93	2.23 <sup>a</sup> $\pm$ 0.53	1.22 <sup>a</sup> $\pm$ 0.16	0.10 <sup>b</sup> $\pm$ 0.01
Desamargado	0.67 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06	2.07 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.71	314.07 <sup>a</sup> $\pm$ 42.80	2.65 <sup>a</sup> $\pm$ 0.32	1.20 <sup>a</sup> $\pm$ 0.13	0.12 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01
Extruido	0.68 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04	2.59 <sup>a</sup> $\pm$ 0.62	312.00 <sup>a</sup> $\pm$ 35.87	2.65 <sup>a</sup> $\pm$ 0.32	1.03 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.22	0.10 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.01
Bebida secada por aspersión (goma arábica)	0.52 <sup>b</sup> $\pm$ 0.06	1.49 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.30	202.85 <sup>b</sup> $\pm$ 36.44	2.11 <sup>a</sup> $\pm$ 0.36	0.72 <sup>b</sup> $\pm$ 0.22	0.06 <sup>c</sup> $\pm$ 0.01
Bebida secada por aspersión (maltodextrina)	0.55 <sup>b</sup> $\pm$ 0.02	1.68 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.33	211.68 <sup>b</sup> $\pm$ 39.42	2.10 <sup>a</sup> $\pm$ 0.27	0.79 <sup>b</sup> $\pm$ 0.27	0.05 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02

Las medias con diferentes letras en superíndice en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.2 Efecto del proceso en los carotenoides

Los carotenoides como la luteína y zeaxantina fueron encontrados en pequeñas cantidades en el lupino Andino (Tabla 8). En términos generales, se encontró más luteína que zeaxantina en todas las muestras de lupino procesado. Por otro lado, no existe mucha información sobre la presencia de los carotenoides en el lupino procesado o leguminosas similares, para poder comparar y discutir.

En el lupino amargo, se encontró poca cantidad de luteína ( $1.22 \pm 0.16$  mg/kg MS) y una mínima cantidad de zeaxantina ( $0.10 \pm 0.01$  mg/kg MS), valores muy cercanos a los encontrados en la harina de trigo para pan por Hidalgo *et al.* (2019), quienes reportaron 1.6 y 0.1 mg/kg MS de luteína y zeaxantina, respectivamente. Por otro lado, la presencia de estos carotenoides varió en función al tipo de genotipo del lupino, siendo Yunguyo el que tuvo más luteína ( $1.39 \pm 0.12$  mg/kg MS) y Altagracia para el caso de zeaxantina ( $0.11 \pm 0.00$  mg/kg MS) (Anexo 7). De la misma forma, Skrajda-Brdak *et al.* (2019) demostraron que la luteína y zeaxantina varían de acuerdo al genotipo, en muestras de trigo espelta.

El proceso de desamargado (hidratación, cocción y lavados sucesivos) no modificó significativamente ( $p \geq 0.05$ ) el contenido de luteína del lupino amargo, pero lo disminuyó ligeramente; esta reducción (de  $1.22 \pm 0.16$  mg/kg a  $1.20 \pm 0.13$  mg/kg MS) probablemente se debió al factor cocción, debido a que durante la ebullición se pudo observar un ligero cambio de coloración en el agua y en los granos. Similares resultados fueron obtenidos por Giambanelli *et al.* (2020), quienes demostraron que la cocción disminuye el contenido de luteína, en granos y espigas de trigo einkorn. El efecto del proceso de extrusión sobre los contenidos de luteína y zeaxantina no fue significativo; sin embargo, las cantidades de luteína y zeaxantina en la harina extruida fueron menores en comparación a las muestras desamargadas, esto probablemente se debieron a las modificaciones físicas y químicas que sufrieron los granos de lupino desamargado durante el proceso de extrusión. El proceso de extrusión afecta ligeramente a los carotenoides siempre en cuando se trabaje con los parámetros correctos (humedad, temperatura, velocidad de tornillo) de extrusión (Waramboi *et al.* 2013); este enunciado se pudo corroborar con los resultados obtenidos en esta investigación. Por otro lado, Kourouma *et al.* (2019) mencionaron que los procesos tecnológicos, como el proceso de tostado afectan significativamente a los carotenoides ( $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno).

El proceso de secado por aspersión afectó significativamente a luteína y zeaxantina; por consiguiente, la presencia de estos carotenoides fue menor en las muestras secadas por aspersión frente a las desamargadas. La coloración amarillenta de los granos de lupino desamargado se fueron perdiendo durante el proceso tecnológico (elaboración de la bebida y secado por aspersión). El color del producto final obtenido (bebida de lupino en polvo) fue blanquecino, y quizás esto sea uno de los factores del porque se encontró muy poca presencia de estos carotenoides; tal como lo mencionaron Liang *et al.* (2020) que los carotenoides son responsables mayormente del color amarillo, naranja y rojo en los alimentos. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, la zeaxantina es menos estable que la luteína durante el proceso de secado por aspersión. En cambio, en el proceso de horneado para la elaboración del pan tipo bollo, la zeaxantina es más estable que la luteína (Paznocht *et al.* 2019). Por otro lado, los agentes encapsulantes (goma arábiga y maltodextrina) usados en el proceso de aspersión no evitaron la degradación de la luteína y zeaxantina presentes en el lupino. De la misma forma, Lim y Roos (2018) observaron degradación de carotenoides independientemente del tipo de agente encapsulante usado durante el secado por aspersión.

Además, no hubo diferencias significativas entre las muestras con maltodextrina y goma arábica; sin embargo, se encontró más luteína que zeaxantina en muestras con maltodextrina.

## V. CONCLUSIONES

1. La composición química proximal de las harinas de lupino fue modificada por los procesos tecnológicos. La composición química proximal de la materia seca del lupino desamargado cambió (proteínas y lípidos aumentaron; cenizas y carbohidratos disminuyeron). El proceso de extrusión y el proceso de secado por aspersion mejoraron la digestibilidad *in vitro* de la proteína del lupino, sin inducir daños térmicos relevantes, debido a la reducción del contenido de azúcares durante el proceso de desamargado. El marcador de daño térmico más sensible identificado para el lupino fue la furosin. La composición química proximal y demás análisis realizadas en esta investigación variaron en función al genotipo, siendo mayormente Altagracia el que presentó mejores cualidades durante el procesamiento frente a los demás genotipos.
2. Los compuestos fenólicos totales y su capacidad antioxidante variaron en función al tipo de proceso (desamargado, extrusión y secado por aspersion) y genotipo (Altagracia, Andenes y Yunguyo). El secado por aspersion afectó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) a los compuestos fenólicos totales (TPC) y su actividad antioxidante, disminuyéndolos en contenido. La capacidad antioxidante de las muestras procesadas varió de 2.87 – 4.10 y 3.12 – 4.73  $\mu\text{mol Trolox/g b.s}$ . (método DPPH), en muestras sin desengrasar y desengrasadas, respectivamente. El contenido de fenoles totales estuvo entre 0.64 – 1.10 y 0.75 – 1.33 mg AGE/g b.s, para muestras sin desengrasar y desengrasadas, respectivamente. En la mayoría de los procesos, se observó que el genotipo Yunguyo fue el que presentó más cantidad de TPC, y Altagracia en capacidad antioxidante, frente a los demás genotipos.
3. El  $\gamma$ -tocoferol se encontró en mayor cantidad en todas las muestras de lupino sin procesar y procesado; la luteína fue el carotenoide con mayor presencia y además se encontraron trazas de zeaxantina. El desamargado y la extrusión no afectaron significativamente ( $p \geq 0.05$ ) los contenidos de los tocoferoles y carotenoides. Por lo tanto, el efecto del

proceso tecnológico (desamargado, extrusión y secado por aspersión) no disminuyó considerablemente los contenidos de tocoferoles y carotenoides. El contenido de tocoferoles y carotenoides variaron en función al genotipo. Mayormente, el genotipo Yunguyo tuvo más tocoferoles y carotenoides que los demás genotipos, a lo largo de los procesos tecnológicos. Los tocoferoles y carotenoides encontrados en el lupino sin procesar y procesado son sustanciales para la alimentación humana.

## VI. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los estudios realizados en la investigación, y con fines de potenciar la investigación, se recomienda:

1. Evaluar la estabilidad de los componentes bioactivos de la bebida de lupino durante su vida en anaquel.
2. Formular mezclas alimenticias preservando sus componentes bioactivos a partir de harina desamargada y extruida de *Lupinus mutabilis*.
3. Elaborar formulas alimenticias a partir del lupino en polvo (bebida de lupino secado por aspersión) para deportistas que requieren consumo de proteínas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ait-Ameur, L; Mathieu, O; Lalanne, V; Trystram, G; Birlouez-Aragon, I. 2007. Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. *Food Chemistry*, 101:1424-1433.
- Akkan, AA; Özdemir, Y; Ekiz, HL. 2001. Derivative spectrophotometric determination of 5(hydroxymethyl)-2-furaldehyde HMF and furfural in Locust an extract. *Nahrung/Food*, 45(1):43-46.
- Almeida, CC; Monteiro, MLG; Costa-Lima, BRC; Alvares, TS; Conte-Junior, CA. 2015. *In vitro* digestibility of commercial whey protein supplements. *LWT - Food Science and Technology*, 61: 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.038>
- Alonso, R; Aguirre, A; Marzo, F. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food chemistry*, 68: 159-165.
- Anton, AA; Fulcher, R; Arntfield, S.D. 2009. Physical and nutritional impact of fortification of corn starch-based extruded snacks with common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) flour: Effects of bean addition and extrusion cooking. *Food Chemistry*, 113(4): 989–996.
- A.O.A.C. 2000. Official methods of analysis (17th Ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists International.
- Arnoldi, A; Boschini, G; Zanoni, C; Lammi, C. 2015. The health benefits of sweet lupin seed flours and isolated proteins. *Journal of Functional Foods*, 18: 550–563.
- Arnoldi, A; Resta, D; Brambilla, F; Boschini, G; D'Agostina, A; Sirtori, E; O'Kane, F. 2007. Parameters for the evaluation of the thermal damage and nutraceutical potential of lupin-based ingredients and food products. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 431–436. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600246>
- Bähr, M; Fechner, A; Hasenkopf, K; Mittermaier, S; Jahreis, G. 2014. Chemical composition of dehulled seeds of selected lupin cultivars in comparison to pea and soya bean. *LWT - Food Science and Technology*, 59: 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.026>

- Berghout, JAM; Boom, RM; Goot, AJ. 2015. Understanding the differences in gelling properties between lupin protein isolate and soy protein isolate. *Food Hydrocolloids* 43: 465–472.
- Boostani, S; Aminlari, M; Moosavi-nasab, M; Niakosari, M; Mesbahi, G. 2017. Fabrication and characterization of soy protein isolate-grafted dextran biopolymer: A novel ingredient in spray-dried soy beverage formulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.019>
- Boschin, G; Arnoldi, A. 2011. Legumes are valuable sources of tocopherols. *Food Chemistry*, 127:1199–1203.
- Borquez, AS. 2008. Evaluación nutricional del lupino blanco (*Lupinus albus*) como fuente alternativa de proteínas en dietas comerciales para salmónidos en Chile. Tesis para optar el grado de Doctor. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. España.
- Bramley, PM; Elmadfa, I; Kafatos, A; Kelly, FJ; Manios, Y; Rexborough, HE; Schuch, W; Sheehy, PJA; Wagner, KH. 2000. Vitamin E: review. *Journal of Science and Food Agricultural*, 80:913–938.
- Brennan, C; Brennan, M; Derbyshire, E; Tiwari, BK. 2011. Effects of extrusion on the polyphenols, vitamins and antioxidant activity of foods. *Trends in Food Science and Technology* 22(10): 570–575.
- Burel, C; Boujard, T; Tulli, F; Kaushik, SJ. 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 188(3–4): 285–298. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00337-9)
- Caligari, PDS; Römer, P; Rahim, MA; Huyghe, C; Neves-Martins, J; Sawicka-Sienkiewicz, EJ. 2000. The potential of *Lupinus mutabilis* as a crop. In linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century (pp. 569-573). Springer, Dordrecht.
- Camarena, F.; Huaranga, A.; Jiménez, J. & Mostacero, E. 2012. Revalorización de un cultivo subutilizado: Chocho o Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Primera Edición. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina-Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). 219pp.
- Cano, A; Arnao, MB. 2004. Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica y contenido en vitamina C de zumos de naranja comerciales: relación con sus características organolépticas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 4(3): 185-189.

- Capuano, E; Ferrigno, A; Acampa, I; Ait-Ameur, L; Fogliano, V. 2008. Characterization of Maillard reaction in bread crisps. *European Food Research and Technology*, 228:311-319.
- Carvajal-Larenas, FE; van Boekel, MJAS; Koziol, M; Nout, MJR; Linnemann, AR. 2014. Effect of processing on the diffusion of alkaloids and quality of *Lupinus mutabilis* Sweet. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38: 1461-1471. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12105>
- Carvajal-Larenas, FE; Linnemann, AR; Nout, MJR; Koziol, M; van Boekel, MAJS. 2016. *Lupinus mutabilis*: composition, uses, toxicology, and debittering. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56: 1454-1487. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772089>
- Castro, MR; Hernández, JA; Marcilla, Sh; Córdova-Ramos, JS; Solari, FA; Chire, GC. 2016. Efecto del contenido de grasa en la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de *Teobroma cacao* L. "cacao". *Ciencia e Investigación* 19(1): 19-23.
- Cavallero, A; Gianinetti, A; Finocchiaro, F; Delogu, G; Stanca, AM. 2004. Tocols in hull-less and hulled barley genotypes grown in contrasting environments. *Journal of Cereal Science*, 39(2): 175–180. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00072-9](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00072-9)
- Cazzonelli, CI. 2011. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 38:833–847. doi: 10.1071/FP11192
- Chen, FL; Wei, YM; Zhang, B. 2011. Chemical cross-linking and molecular aggregation of soybean protein during extrusion cooking at low and high moisture content. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 957-962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.008>
- Corbo, MR; Bevilacqua, A; Petruzzi, L; Casanova, FP; Sinigaglia, M. 2014. Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6): 1192–1206. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12109>
- Cortés-Avendaño, P., Tarvainen, M., Suomela, J. P., Glorio-Paulet, P., Yang, B., & Repo-Carrasco-Valencia, R. 2020. Profile and content of residual alkaloids in ten ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after aqueous debittering process. *Plant Foods for Human Nutrition*. Published online: <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00799-y>
- Czubinski, J; Wroblewska, K; Czyzniejewski, M; Górnaś, P; Kachlicki, P; Siger, A. 2019. Bioaccessibility of defatted lupin seed phenolic compounds in a standardized static in vitro digestion system. *Food Research International* 116: 1126–1134.

- D'Agostina, A; Boschin, G; Resta, D; Annicchiarico, P; Arnoldi, A. 2008. Changes of isoflavones during the growth cycle of *Lupinus albus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56:4450–4456.
- Dąbrowski, G; Czaplicki, S; Konopka, I. 2019. Fractionation of sterols, tocopherols and squalene in flaxseed oils under the impact of variable conditions of supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 83:103261. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103261>
- Delgado-Andrade, C; Rufián-Henares, JA; Morales, FJ. 2005. Fast method to determine furosine in breakfast cereals by capillary zone electrophoresis. *European Food Research and Technology*, 221:707–711.
- Delgado-Andrade, C; Rufián-Henares, JA; Morales, FJ. 2007. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chemistry*, 100:725–731.
- Dueñas, M; Hernández, T; Estrella, I; Fernández, D. 2009. Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius L.*). *Food Chemistry*, 117(4): 599–607.
- Dueñas, M; Hernández, T; Lamparski, G; Estrella, I; Muñoz, R. 2012. Bioactive Phenolic Compounds of Soybean (*Glycine max cv. Merit*): Modifications by Different Microbiological Fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(4): 241–250. <https://doi.org/10.2478/v10222-012-0060-x>
- El-Hady, EAA; Habiba, RA. 2003. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 36: 285–293. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00217-7](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00217-7)
- Erbaş, M. 2010. The effects of different debittering methods on the production of lupin bean snack from bitter *Lupinus albus L.* seeds. *Journal of Food Quality*, 33: 742–757. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2010.00347.x>
- Erbaş, M; Certel, M; Uslu, MK. 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus L.*). *Food Chemistry*, 89: 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.040>
- Ertaş, N; Bilgiçli, N. 2012. Effect of different debittering processes on mineral and phytic acid content of lupin (*Lupinus albus L.*) seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 51: 3348–3354. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0837-2>

- Faris, RJ; Wang, H; Wang, T. 2008. Improving digestibility of soy flour by reducing disulfide bonds with thioredoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16): 7146–7150. <https://doi.org/10.1021/jf801136n>
- Fernandez-Artigas, P; Guerra-Hernández, E; García-Villanova, B. 2001. Changes in sugar profile during infant cereal manufacture. *Food Chemistry*, 74:499-505.
- Fernández-Marín B; Míguez, F; Méndez-Fernández, L; Agut, A; Becerril, JM; García-Plazaola, JI; Kranner, I; Colville, L. 2017. Seed carotenoid and tocopherol composition of wild fabaceae species is shaped by phylogeny and ecological factors. *Frontiers in Plant Science*, 8:1428. doi: 10.3389/fpls.2017.01428
- Fernandez-Orozco, R; Frias, J; Zielinski, H; Piskula, M; Kozłowska, H; Vidal-Valverde, C. 2008. Kinetics of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. Jutro and *Glycine max* cv. Merit. *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.food.chem.2008.04.028.
- Ferragut, V; Hernández-Herrero, M; Veciana-Nogús, MT; Borrás-Suarez, M; González-Linares, J; Vidal-Carou, MC; Guamis, B. 2015. Ultra-high-pressure homogenization (UHPH) system for producing high-quality vegetable-based beverages: Physicochemical, microbiological, nutritional and toxicological characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5): 953–961. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6769>
- Frías, J; Giacomino, S; Peñas, E; Pellegrino, N; Ferreyra, V; Apro, N; Carrión, MO; Vidal-Valverde, C. 2011. Assessment of the nutritional quality of raw and extruded *Pisum sativum* L. var. laguna seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1303-1308. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.025>
- Frias, J; Miranda, ML; Doblado, R; Vidal-Valverde, C. 2005. Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var Multolupa. *Food Chemistry*, 92:211–220.
- García-Lopez, PM; Kachlicki, P; Zamora-Natera, F; Ruiz-Moreno, J; Stobiecki, M. 2006. Profiling isoflavone conjugates in different organs of *Lupinus exaltatus* Zucc. *Phytochemical Analysis*, 17:184–191.
- Ghumman, A; Kaur, A; Singh, N; Singh, B. 2016. Effect of feed moisture and extrusion temperature on protein digestibility and extrusion behavior of lentil and horsegram. *LWT – Food Science and Technology*, 70: 349-357.

- Giambanelli, E; Ferioli, F; D'Antuono, LF. 2020. The fate of bioactive compounds during traditional preparation of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) bulgur. Journal of Cereal Science, 91: 102890. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102890>
- Glencross, B; Sweetingham, M; Hawkins, W. 2010. A digestibility assessment of pearl lupin (*Lupinus mutabilis*) meals and protein concentrates when fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 303(1–4): 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.015>
- Gökmen, V; Açar, ÖC; Serpen, A; Morales, FJ. 2008. Effect of leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking. European Food Research and Technology, 226:1031-1037.
- Gökmen, V; Senyuva, HZ. 2007. Effects of some cations on the formation of acrylamide and furfurals in glucose-asparagine model system. European Food Research and Technology, 225:815-820.
- Gökmen, V; Senyuva, HZ. 2006. Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:2845-2849.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(88\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0889-1575(88)90035-X)
- Güemes-Vera, N; Esperza, OAR; Dávila-Ortiz, G. 2004. Structural analysis of the *Lupinus mutabilis* seed, its flour, concentrate, and isolate as well as their behavior when mixed with wheat flour. LWT - Food Science and Technology, 37: 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.07.001>
- Guerra-Hernández, E; Ramirez-Jiménez, A; García-Villanova, B. 2002. Glucosylisomaltol, a new indicator of browning reaction in baby cereals and bread. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50:7282-7287.
- Guerreo-Ochoa, MR; Pedreschi, R; Chirinos, R. 2015. Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). International Journal of Food Science and Technology 50(8): 1815–1822.
- Hassanein, MMM; El-Shami, SM; El-Mallah, MH. 2011. Investigation of lipids profiles of Nigella, Lupin and Artichoke seed oils to be used as healthy oils. Journal of Oleo Science, 60:99–107.

- Hickisch, A; Beer, R; Vogel, RF; Toelstede, S. 2016. Influence of lupin-based milk alternative heat treatment and exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the physical characteristics of lupin-based yogurt alternatives. *Food Research International*, 84: 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.037>
- Hidalgo, A; Brandolini, A; Pompei, C. 2010. Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chemistry*, 121: 746-751. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.056>
- Hidalgo, A; Brandolini, A. 2011. Tocols stability during bread, water biscuit and pasta processing from wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 52: 254-259. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.06.002>
- Hidalgo, A; Brandolini, A. 2011. Heat damage of water biscuits from einkorn, durum and bread wheat flours. *Food Chemistry*, 128: 471-478. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.056>
- Hidalgo, A; Scuppa, S; Brandolini, A. 2016. Technological quality and chemical composition of puffed grains from einkorn (*Triticum monococcum L. subsp. monococcum*) and bread wheat (*Triticum aestivum L. subsp. aestivum*). *LWT - Food Science and Technology*, 68: 541-548. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.068>
- Hidalgo, A; Tumbas Šaponjac, V; Četković, G; Šeregelj, V; Čanadanović-Brunet, J; Chiosa, D; Brandolini, A. 2019. Antioxidant properties and heat damage of water biscuits enriched with sprouted wheat and barley. *LWT - Food Science and Technology*, 114:108423. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108423>
- Hur, S; Jin, BO; Lim, EA; Decker, D; Julian, M. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125: 1-12.
- Ibarz, A; Pagán, J; Garza, S. 2000. Kinetic models of nonenzymatic browning in apple puree. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8):1162-1168.
- Islam, N; Khalil, I; Islam A; Gan S. H. 2014. Toxic compounds in honey. *Journal of Applied Toxicology*, 34: 733–742.
- Jacobsen, S; Mujica, A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. *Revista botánica económica de los andes centrales*, 458-482.
- Jiménez, MC; Dávila, OG; Hernández, SH. 2000. Producing milk-and yoghurt-like products from *Lupinus campestris* seed. In: Santen, E. van; Wink, M.; Weissmann, S.; Römer, P. Lupin, an ancient crop for the new millennium: Proceedings of the 9th International Lupin Conference, Klink/Muritz, Germany, 20-24 June, 1999. (pp. 442-445). International Lupin Association.

- Jiménez-Martínez, C; Hernández-Sánchez, H; Dávila-Ortiz, G. 2007. Diminution of quinolizidine alkaloids, oligosaccharides and phenolic compounds from two species of lupinus and soybean seeds by the effect of *Rhizopus oligosporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(7): 1315–1322.
- Jinapong, N; Suphantharika, M; Jamnong, P. 2008. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 84:194–205.
- Jung, J; Gim, SY; Lee, C; Kim, MJ; Lee, JH. 2017. Stability of tocopherol homologs in soybean, corn, canola, and olive oils under different moisture contents at 25°C. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(6): 1–11. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600157>
- Kaczmarek, KT; Chandra-Hioe, MV; Frank, D; Arcot, J. 2018. Aroma characteristics of lupin and soybean after germination and effect of fermentation on lupin aroma. *LWT - Food Science and Technology*, 87: 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.080>
- Kalogeropoulos, N; Chiou, A; Ioannou, M; Karathanos, VT; Hassapidou, M; Andrikopoulos, NK. 2010. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chemistry*, 121:682– 690.
- Kamal-Eldin, A; Appelquist, LA. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7):671-701.
- Kan, L; Nie, S; Hu, J; Wang, S; Bai, Z; Wang, J; Zhou, Y; Jiang, J; Zeng, Q; Song K. 2018. Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chemistry*, 260:317-326.
- Karamać, M; Orak, HH; Amarowicz, R; Orak, A; Piekoszewski, W. 2018. Phenolic contents and antioxidant capacities of wild and cultivated white lupin (*Lupinus albus L.*) seeds. *Food Chemistry*, 258: 1–7.
- Kourouma, V; Mu, TH; Zhang, M; Sun, HN. 2019. Effects of cooking process on carotenoids and antioxidant activity of orange-fleshed sweet potato. *LWT - Food Science and Technology*, 104: 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.011>
- Kramholer, B; Ledl, F; Lerche, H; Severin, T. 1992. HPLC separation of some characteristic components in reactions mixtures of disaccharides with amines model system for milk and cereal products. *Z Lebensm Unters Forch*, 194:431-433. <https://doi.org/10.1007/BF01197723>

- Kroh, LW. 1994. Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry*, 51:373-379.
- Lammi, C; Aiello, G; Vistoli, G; Zanoni, Ch; Arnoldi, A; Sambuy, Y; Ferruzza, S; Ranaldi, G. 2016. A multidisciplinary investigation on the bioavailability and activity of peptides from lupin protein. *Journal of Functional Foods*, 24: 297–306.
- Lampart-Szczapaa, E; Korczakb, J; Nogala-Kaluckaa, M; Zawirska-Wojtasiakc, R. 2003. Antioxidant properties of lupin seed products. *Food Chemistry*, 83:279–285.
- Lampart-Szczapa, E; Konieczny, P; Nogala-Kałucka, M; Walczak, S; Kossowska, I; Malinowska, M. 2006. Some functional properties of lupin proteins modified by lactic fermentation and extrusion. *Food Chemistry*, 96: 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.031>.
- Lee, HS; Nagy, S. 1990. Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethyl furfural in sugar-catalyst model systems. *Journal of Food Processing and Preservation*, 14:171-178.
- Liang, M; Su, X; Yang, Z; Deng, H; Yang, Z; Liang, R; Huang, J. 2020. Carotenoid composition and expression of carotenogenic genes in the peel and pulp of commercial mango fruit cultivars. *Scientia Horticulturae*, 263: 109072. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109072>
- Lin, S; Huff, HE; Hsieh, F. 2002. Extrusion process parameters, sensory characteristics, and structural properties of a high moisture soy protein meat analog. *Journal of Food Science*, 67(3):1066–1072.
- Lim, ASL; Roos, YH. 2018. Amorphous wall materials properties and degradation of carotenoids in spray dried formulations. *Journal of Food Engineering*, 223: 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.001>
- Lim, K; Ma, M; Dolan, KD. 2011. Effects of spray drying on antioxidant capacity and anthocyanidin content of blueberry by-products. *Journal of Food Science* 76(7): 156-164.
- Liu, R; Liu, R; Shi, L; Zhang, Z; Zhang, T; Lu, M; Chang, M; Jin, Q; Wang, X. 2019. Effect of refining process on physicochemical parameters, chemical compositions and *in vitro* antioxidant activities of rice bran oil. *LWT-Food Science and Technology* 109: 26–32.
- Marrouí, MEL; González, MYV; Flores, SEP. 2011. Chemical composition of “oca” (*Oxalis tuberosa*), “arracacha” (*Arracaccia xanthorrhiza*) and “tarwi” (*Lupinus mutabilis*). Formulation of a base mixture for food. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2: 239-252.

- Martínez-Villaluenga, C; Zielínski, H; Frias, J; Piskula, MK; Kozłowska, H; Vidal-Valverde, C. 2009. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chemistry*, 112(1): 84–88.
- McClement, DJ; Newman, E; McClement, IF. 2019. Plant-based milks: A review of the science underpinning their Design, fabrication, and performance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18: 2047-2067.
- Meléndez-Martínez, AJ. 2019. An overview of carotenoids, apocarotenoids, and vitamin A in agro-food, nutrition, health, and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63:1801045. DOI: 10.1002/mnfr.201801045
- Miano, AC; García, JA; Augusto, PED. 2015. Correlation between morphology, hydration kinetics and mathematical models on Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) grains. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2): 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.032>
- Mohamed, AA; Rayas-Duarte, P. 1995. Composition of *Lupinus albus*. *Cereal Chemistry*, 72: 643-647.
- Mohammed, MA; Mohamed, EA; Yagoub, AEA; Mohamed, AR; Babiker, EE. 2017. Effect of processing methods on alkaloids, phytate, phenolics, antioxidants activity and minerals of newly developed lupin (*Lupinus albus L.*) cultivar. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1): 1–9.
- Mokrane, H; Houria, A; Naima, BB; Christophe, MC; Jan, AD; Boubekeur, N. 2010. Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor (L.) Moench*] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility. *Food Chemistry*, 121: 719-723.
- Murkovic, M; Pichler, N. 2006. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50:842-846.
- Musco, N; Cutrignelli, MI; Calabrò, S; Tudisco, R; Infascelli, F; Grazioli, R; Lo Presti, V; Gresta, F; Chiofalo, B. 2017. Comparison of nutritional and antinutritional traits among different species (*Lupinus albus L.*; *Lupinus luteus L.*; *Lupinus angustifolius L.*) and varieties of lupin seeds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101: 1227–1241. <https://doi.org/10.1111/jpn.12643>
- Nangpal, A; Reuter, H; Dehn-Muller, B; Erbersdobler, HF. 1990. Formation of furosine during UHT treatment of milk – comparison between direct and indirect heating, *Kieler Milchw.Forsch.ber*, 42:43–51.

- Neves, J. 1993. Lupin genetic resources around the world. *Grain Legumes. The magazine of the European association for grain legume research.* 3:15-17.
- Oomah, BD; Tiger, N; Olson, M; Balasubramanian, P. 2006. Phenolics and antioxidative activities in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius L.*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(2): 91–97.
- Palanisamy, M; Franke, K; Berger, RG; Heinz, V; Töpfl, S. 2018. High moisture extrusion of lupin protein: Influence of extrusion parameters on extruder responses and product properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.9410>
- Paraskevopoulou, A; Chrysanthou, A; Koutidou, M. 2012. Characterisation of volatile compounds of lupin protein isolate-enriched wheat flour bread. *Food Research International*, 48(2): 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.028>
- Paucar-Menacho, LM; Amaya-Farfán, J; Berhow, MA; Mandarino, JMG; Mejia, EG; Chang, YK. 2010. A high-protein soybean cultivar contains lower isoflavones and saponins but higher minerals and bioactive peptides than a low-protein cultivar. *Food Chemistry*, 120: 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.062>
- Paznocht, L; Kotíková, Z; Orsák, M; Lachman, J; Martinek, P. 2019. Carotenoid changes of colored-grain wheat flours during bun-making. *Food Chemistry*, 277: 725–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.019>
- Perez-Locas, C; Yaylayan, VA. 2008. Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56:6717-6723.
- Perez-Munor, F; Flores, RA. 1997. Characterization of a spray drying system for soymilk. *Drying Technology*, 15:1023–1043.
- Pires, C; Vieira, MG; José, CR; Neuza, MBC. 2006. Nutritional quality and chemical score of amino acids from different protein sources. *Food Science and Technology*, 26: 179-187.
- 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.
- Plank, DW; Szpylka, J; Sapirstein, H; Woollard, D; Zapf, ChM; Lee, V; Chen, C-YO; Liu, RH; Tsao, R; Düsterloh, A; Baugh, S. 2012. Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl: Collaborative study first action 2012.04. *Journal of AOAC International* 95: 1562–1570.

- Rada-Mendoza, M; Sanz, ML; Olano, A; Villamiel, M. 2004. Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 85:605-609.
- Ramachandra, HG; Thejaswini, ML. 2015. Extrusion technology: A novel method of food processing. *International Journal of Innovative Science, Engineering Technology*, 2(4): 358–369.
- Ramírez-Jiménez, A; García-Villanova, B; Guerra-Hernández, E. 2000. Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Research International*, 33(6):833-838.
- Ramos-Díaz, JM; Suuronen, JP; Deegan, KC; Serimaa, R; Tuorila, H; Jouppila, K. 2015. Physical and sensory characteristics of corn-based extruded snacks containing amaranth, quinoa and kañiwa flour. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2): 1047–1056. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.011>
- Ranilla, LG; Genovese, MI; Lajolo, FM. 2009. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5): 397–404.
- Resmini, P; Pellegrino, L; Pagani, MA; De-Noni, I. 1993. Formation of 2-acetyl-3-D-glucopyranosylfuran (glucosylisomaltol) from nonenzymatic browning in pasta drying. *Italian Journal of Food Science*, 4:341-353.
- Ricardo-da-Silva, JM; Laureano, O; Beirao-da-Costa, ML. 1993. Total phenol and proanthocyanidin evaluation of *Lupinus* species. In: *International Lupin Conference Evora, Portugal*. (Edited by J.M. Martins & M.L. Beirao da Costa), Pp. 250–254. Lisbon: ISA Press.
- Rowles, JL; Erdman, JW. 2020. Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, (January): 158613. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158613>
- Rufián-Henares, JA; Delgado-Andrade, C; Morales, FJ. 2006. Application of a reverse phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *Journal of AOAC International*, 89:1-5.
- Rufián-Henares, JA; Delgado-Andrade, C; Jiménez-Pérez, S; Morales, FJ. 2007. Assessing nutritional quality of milk based sport supplements as determined by furosine. *Food Chemistry*, 101:573–578.

- Rufián-Henares, JA; García-Villanova, B; Guerra-Hernández, E. 2008. Occurrence of furosine and hydroxymethylfurfural as markers of thermal damage in dehydrated vegetables. *European Food Research and Technology*, 228: 249-256.
- Rumiyati, R; Jayasena, V; James, AP. 2013. Total phenolic and phytosterol compounds and the radical scavenging activity of germinated Australian Sweet Lupin flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68:352–357.
- Rumiyati, R; James, AP; Jayasena, V. 2015. Effects of lupin incorporation on the physical properties and stability of bioactive constituents in muffins. *International Journal of Food Science and Technology*, 50: 103–110. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12688>
- Saini, RK; Keum, YS. 2016. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, 82: 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.025>
- Sbihi, HM; Nehdi, IA; Tan, CP; Al-Resayes, SI. 2013. Bitter and sweet lupin (*Lupinus albus* L.) seeds and seed oils: A comparison study of their compositions and physicochemical properties. *Industrial Crops and Products*, 49: 573–579. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.020>
- Shahidi, F; Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18: 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Schoeneberger, H; Gross, R; Cremer, HD; Elmadfa, I. 1982. Composition and protein quality of *Lupinus mutabilis*. *The Journal of Nutrition*, 112: 70-76. <https://doi.org/10.1093/jn/112.1.70>
- Skrajda-Brdak, M; Konopka, I; Tańska, M; Sulewska, H. 2019. Lipophilic fraction and its antioxidant capacity in sixteen spelt genotypes cultivated in Poland. *Journal of Cereal Science*, 89:102809. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102809>
- Siger, A; Czubinski, J; Kachlicki, P; Dwiecki, K; Lampart-Szczapa, E; Nogala-Kalucka, M. 2012. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2): 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.10.002>
- Slavin, M; Cheng, Z; Luther, M; Kenworthy, W; Yu, L. 2009. Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Maryland-grown soybean lines with altered fatty acid profiles. *Food Chemistry*, 114:20–27.

- Solís-Casanova, E; Contreras-Calderón, J; Guerra-Hernández, EJ; B. García-Villanova, B. 2011. Usefulness of determination of glucosylisomaltol and hydroxymethylfurfural to control browning reaction during storage of baby cereals. *CyTA - Journal of Food*, 9(2):141–145.
- Sosnik, A; Seremeta, KP. 2015. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223: 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>
- Sujak, A; Kotlarz, A; Strobel, W. 2006. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chemistry*, 98: 711–719. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.036>
- Sun, LC; Sridhar, K; Tsai, PJ; Chou, CS. 2019. Effect of traditional thermal and high-pressure processing (HPP) methods on the color stability and antioxidant capacities of Djulis (*Chenopodium formosanum Koidz.*). *LWT- Food Science and Technology*, 109: 342–349.
- Thambiraj, SR; Phillips, M; Koyyalamudi, SR; Reddy, N. 2018. Yellow lupin (*Lupinus luteus L.*) polysaccharides: Antioxidant, immunomodulatory and prebiotic activities and their structural characterisation. *Food Chemistry*, 267: 319–328.
- Tirelli, A; Pellegrino, L. 1995. Determination of furosine in dairy products by capillary zone electrophoresis; a comparison with the HPLC method. *Italian Journal of Food Science*, 7:379–385.
- Traber, MG; Atkinson, J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43:4–15.
- Tsaliki, E; Lagouri, V; Doxastakis, G. 1999. Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus ssp. Graecus*). *Food Chemistry*, 65(1): 71–75.
- Uzun, B; Arslan, C; Karhan, M; Toker, C. 2007. Fat and fatty acids of white lupin (*Lupinus albus L.*) in comparison to sesame (*Sesamum indicum L.*). *Food Chemistry*, 102(1): 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.059>
- Villarino, CBJ; Jayasena, V; Coorey, R; Chakrabarti-Bell, S; Foley, R; Fanning, K; Johnson, SK. 2015. The effects of lupin (*Lupinus angustifolius*) addition to wheat bread on its nutritional, phytochemical and bioactive composition and protein quality. *Food Research International*, 76: 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.046>

- Villarino, CBJ; Jayasena, V; Coorey, R; Chakrabarti-Bell, S; Johnson, S. 2015. Optimization of formulation and process of Australian sweet lupin (ASL)-wheat bread. *LWT-Food Science and Technology*, 61(2): 359–367.
- Vo, BV; Bui, DP; Nguyen, HQ; Fotedar, R. 2015. Optimized fermented lupin (*Lupinus angustifolius*) inclusion in juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) diets. *Aquaculture* 444: 62–69.
- Wang, S; Clements, J; Palta, JA; Berger, JD. 2008. Antioxidant activities of lupin seeds. In: *Lupins for Health and Wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference* (edited by J.A. Palta & J.B. Berger). Pp. 546–552. Fremantle, Western Australia, 14–18 September 2008. Canterbury, New Zealand: International Lupin Association.
- Wang, T; Soyama, S; Luo, Y. 2016. Development of a novel functional drink from all-natural ingredients using nanotechnology. *LWT - Food Science and Technology*, 73: 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.050>
- Waramboi, JG; Gidley, MJ; Sopade, PA. 2013. Carotenoid contents of extruded and non-extruded sweetpotato flours from Papua New Guinea and Australia. *Food Chemistry*, 141(3): 1740–1746. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.070>
- Wolkers–Rooijackers, JCM; Endika, MF; Smid, EJ. 2018. Enhancing vitamin B12 in lupin tempeh by in situ fortification. *LWT- Food Science and Technology*, 96: 513–518.
- Yilmaz, VA; Brandolini, A; Hidalgo, A. 2015. Phenolic acids and antioxidant activity of wild, feral and domesticated wheats. *Journal of Cereal Science* 64: 168-175.
- Yorgancilar, M; Bilgiçli, N. 2014. Chemical and nutritional changes in bitter and sweet lupin seeds (*Lupinus albus L.*) during bulgur production. *Journal of Food Science and Technology*, 51: 1384-1389. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0640-0>
- Zarei, M; Fazlara, A; Tulabifard, N. 2019. Effect of thermal treatment on physicochemical and antioxidant properties of honey. *Heliyon* 5(6): e01894.
- Zhang, B; Deng, Z; Tang, Y; Chen, P; Liu, R; Ramdath, DD; Liu, Q; Hernandez, M; Tsao, R. 2014. Fatty acid, carotenoid and tocopherol compositions of 20 Canadian lentil cultivars and synergistic contribution to antioxidant activities. *Food Chemistry*, 161:296-304.
- Zhang, J; Zhang, Ch; Chen, X; Quek, SY. 2020. Effect of spray drying on phenolic compounds of cranberry juice and their stability during storage. *Journal of Food Engineering*, 269: 109744.

Zhong, L; Fang, Z; Wahlqvist, ML; Hodgson, JM; Johnson, SK. 2019. Extrusion cooking increases soluble dietary fibre of lupin seed coat. *LWT - Food Science and Technology*, 99: 547-554. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.01>

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Variación total (%) explicada por el tratamiento, el genotipo, su interacción y el error.

	Tratamiento ( <i>T</i> )	Cultivar ( <i>G</i> )	<i>T x G</i>	Error
Humedad	99.99	0.00	0.01	0.00
Lípidos	93.51	4.17	1.69	0.63
Ceniza	96.11	0.90	2.93	0.06
Proteínas	91.63	0.88	7.38	0.11
Carbohidratos	93.49	1.47	4.88	0.16
Digestibilidad de la proteína	94.28	2.02	1.16	2.54
Fructosa	72.56	6.62	19.70	1.12
Glucosa	75.77	5.75	18.33	0.15
Maltosa	99.18	0.12	0.39	0.31
Azúcares reductores	97.45	0.39	1.72	0.44
Sacarosa	92.59	1.57	5.82	0.03
<i>L</i> *	97.93	0.11	1.76	0.21
<i>a</i> *	72.37	2.93	21.26	3.44
<i>b</i> *	96.59	0.54	2.59	0.28
<i>a<sub>w</sub></i>	98.14	0.36	1.47	0.03
Furosina	79.73	5.98	14.04	0.25
Hidroximetilfurfural	95.31	0.37	4.32	0.01
Glicosilisomaltol	97.30	0.54	2.14	0.02

**Anexo 2. Composición química proximal (g/100 g de MS) y digestibilidad *in vitro* de las proteínas (%) de harinas crudas y procesadas de tres genotipos de lupinos andinos.**

	Proteínas	Lípidos	Ceniza	Carbohidratos <sup>1</sup>	Digestibilidad
<u>Amargo</u>					
Altagracia	51.0±0.2	16.0±0.0	4.6±0.14	28.4±0.1	60.9±0.5
Andenes	44.9±0.2	17.4±0.0	4.8±0.07	32.9±0.0	59.9±1.0
Yunguyo	46.2±0.3	15.1±0.0	5.0±0.02	33.7±0.4	62.7±1.0
<u>Desamargado</u>					
Altagracia	57.8±0.2	23.2±0.3	1.6±0.04	17.4±0.3	64.5±0.4
Andenes	52.1±0.6	26.1±0.0	1.9±0.03	19.8±0.8	63.2±0.5
Yunguyo	53.4±0.4	25.1±0.1	1.9±0.02	19.6±0.3	63.5±0.9
<u>Extruido</u>					
Altagracia	58.3±0.4	22.3±0.1	2.0±0.02	17.4±0.4	69.5±0.5
Andenes	54.7±0.5	27.5±0.6	1.3±0.02	16.6±0.9	67.0±0.4
Yunguyo	54.1 ±	24.8 ±	1.7±0.04	19.4 ± 0.4	67.8±0.8
<u>Bebida de</u>					
Altagracia	40.7±0.9	32.8±2.2	0.4±0.01	26.2±2.2	--
Andenes	44.8±0.5	38.9±1.2	0.5±0.01	15.8±0.7	--
Yunguyo	50.4±0.1	35.4±1.3	0.6±0.01	13.6±1.0	--
<u>Lupino en polvo (goma arábica)</u>					
Altagracia	29.4±0.2	15.3±0.1	1.1±0.02	54.1±0.3	75.3±1.5
Andenes	32.9±0.2	18.5±0.1	2.3±0.03	46.3±0.1	72.8±1.5
Yunguyo	33.4±0.4	19.3±0.2	2.3±0.04	45.0±0.7	73.8±1.3
<u>Lupino en polvo (maltodextrin)</u>					
Altagracia	27.2±0.2	13.6±0.1	0.6±0.01	58.6±0.2	73.3±1.8
Andenes	31.3±0.4	16.2±0.4	0.8±0.01	51.7±0.6	72.0±0.8
Yunguyo	36.6±0.4	17.1±0.1	0.8±0.01	45.5±0.5	73.1±0.7

<sup>1</sup> Calculado por diferencia.

**Anexo 3. Contenido de azúcar (fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa, g/100 g de MS) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	Fructosa	Glucosa	Maltosa	Azúcares reductores	Sacarosa
<u>Amargo</u>					
Altagracia	0.89±0.14	nd	0.16±0.01	1.05±0.15	4.26±0.12
Andenes	0.24±0.01	0.20±0.01	0.12±0.00	0.56±0.00	3.06±0.06
Yunguyo	0.43±0.02	0.40±0.02	0.13±0.01	0.96±0.04	5.71±0.10
<u>Desamargado</u>					
Altagracia	nd	nd	nd	nd	nd
Andenes	nd	nd	nd	nd	nd
Yunguyo	nd	nd	nd	nd	nd
<u>Extruido</u>					
Altagracia	nd	nd	nd	nd	nd
Andenes	nd	nd	nd	nd	nd
Yunguyo	nd	nd	nd	nd	nd
<u>Bebida secada por aspersión (goma arábica)</u>					
Altagracia	0.23±0.01	nd	nd	0.23±0.01	nd
Andenes	0.13±0.00	nd	nd	0.13±0.00	0.08±0.00
Yunguyo	0.21±0.00	nd	nd	0.21±0.00	0.15±0.00
<u>Bebida secada por aspersión (maltodextrina)</u>					
Altagracia	nd	0.29±0.00	1.59±0.03	1.88±0.03	0.13±0.00
Andenes	nd	0.33±0.02	1.59±0.14	1.92±0.16	0.13±0.00
Yunguyo	nd	0.33±0.01	1.39±0.11	1.72±0.13	0.13±0.00

nd: no detectado.

**Anexo 4. Coordenadas de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), la diferencia de color ( $\Delta E$ ) y la actividad del agua ( $a_w$ ) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$a_w$	$\Delta E$
<u>Amargo</u>					
Altagracia	84.9±0.5	-2.3±0.3	18.5±0.4	0.59±0.001	-
Andenes	83.5±0.2	-1.6±0.1	21.7±0.7	0.57±0.001	-
Yunguyo	85.4±0.1	-2.5±0.2	20.8±0.9	0.57±0.000	-
<u>Desamarga</u>					
Altagracia	85.9±0.2	-2.3±0.2	15.2±0.1	0.57±0.003	3.49±0.36
Andenes	84.9±0.5	-1.9±0.2	15.7±0.1	0.59±0.002	6.19±0.79
Yunguyo	85.5±0.1	-2.1±0.1	15.4±0.3	0.57±0.001	5.42±0.68
<u>Extruido</u>					
Altagracia	74.5±0.3	-0.5±0.3	25.5±0.2	0.71±0.003	12.72±0.48
Andenes	77.3±0.3	-1.5±0.1	21.4±0.5	0.73±0.000	6.18±0.48
Yunguyo	73.5±0.1	-0.8±0.1	24.6±0.6	0.67±0.004	12.58±0.14
<u>Bebida secada por aspersión (goma arábica)</u>					
Altagracia	92.1±0.4	-1.8±0.1	6.4±0.3	0.38±0.006	14.10±0.57
Andenes	91.9±0.3	-2.5±0.2	8.4±0.5	0.41±0.002	15.76±0.21
Yunguyo	92.0±0.3	-2.4±0.1	8.6±0.2	0.40±0.001	13.83±0.90
<u>Bebida secada por aspersión (maltodextrina)</u>					
Altagracia	93.4±0.5	-2.3±0.2	6.3±0.3	0.39±0.007	14.81±0.35
Andenes	92.4±0.5	-2.6±0.1	8.2±0.2	0.41±0.001	16.22±0.85
Yunguyo	91.9±0.6	-2.5±0.1	8.5±0.3	0.43±0.001	14.41±0.94

**Anexo 5. Índices de daño térmico (furosina, mg/100 g de proteína; hidroximetilfurfural, HMF, mg/kg MS; y glucosilisomaltol, GLI, mg/kg MS) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	Furosina	HMF	GLI
<u>Amargo</u>			
Altagracia	2.4±0.0	nd	nd
Andenes	11.4±0.3	nd	nd
Yunguyo	12.3±0.4	nd	nd
<u>Desamargado</u>			
Altagracia	7.31±0.2	nd	nd
Andenes	11.9±0.4	nd	nd
Yunguyo	12.8±0.2	nd	nd
<u>Extruido</u>			
Altagracia	11.2±0.2	nd	nd
Andenes	8.9±1.8	nd	nd
Yunguyo	6.1±0.1	nd	nd
<u>Bebida secada por aspersión (goma arábica)</u>			
Altagracia	12.0±0.5	0.20±0.01	nd
Andenes	14.3±2.8	nd	nd
Yunguyo	13.8±2.4	0.13±0.00	nd
<u>Bebida secada por aspersión (maltodextrina)</u>			
Altagracia	37.4±1.9	0.60±0.00	0.69±0.01
Andenes	80.5±0.0	0.69±0.01	0.57±0.01
Yunguyo	44.4±0.6	0.50±0.00	0.48±0.00

nd: no detectado.

**Anexo 6. Capacidad antioxidante (DPPH y ABTS<sup>+</sup>) y del contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) de las harinas de tres genotipos de lupino andino.**

	DPPH		ABTS <sup>+</sup>		TPC	
	(μmol Trolox/g b.s.)		(μmol Trolox/g b.s.)		(mg AGE/g b.s.)	
	Sin desengrasar	Desengrasadas	Sin desengrasar	Desengrasadas	Sin desengrasar	Desengrasadas
<i><u>Amargo</u></i>						
Altagracia	5.39±0.09	5.62±0.12	146.72±0.99	161.01±0.32	1.33±0.04	1.50±0.03
Andenes	5.28±0.06	5.59±0.10	156.20±0.55	167.87±0.32	1.35±0.02	1.50±0.04
Yunguyo	5.09±0.11	5.50±0.08	147.39±0.32	161.05±1.69	1.42±0.03	1.53±0.04
<i><u>Desamargado</u></i>						
Altagracia	4.15±0.11	4.76±0.10	72.15±0.37	73.34±2.45	1.03±0.02	1.19±0.01
Andenes	4.05±0.19	4.51±0.10	76.58±0.16	78.08±0.18	1.02±0.00	1.18±0.01
Yunguyo	4.00±0.05	4.16±0.15	73.94±0.43	75.96±0.36	1.07±0.01	1.24±0.00
<i><u>Extruido</u></i>						
Altagracia	4.17±0.10	4.87±0.29	73.03±1.37	74.54±1.90	1.07±0.02	1.31±0.02
Andenes	4.11±0.08	4.69±0.08	77.93±0.74	79.91±0.29	1.05±0.01	1.31±0.01
Yunguyo	4.03±0.06	4.64±0.07	75.73±0.72	76.19±1.19	1.19±0.01	1.35±0.04
<i><u>Bebida secada por aspersión (goma arábica)</u></i>						
Altagracia	2.31±0.09	2.47±0.01	46.66±1.42	58.59±1.07	0.52±0.01	0.56±0.01
Andenes	3.11±0.04	3.31±0.04	53.75±0.88	62.35±1.95	0.68±0.01	0.78±0.02
Yunguyo	3.21±0.14	3.68±0.07	55.88±0.40	66.33±0.97	0.78±0.03	0.92±0.01
<i><u>Bebida secada por aspersión (maltodextrina)</u></i>						
Altagracia	2.26±0.04	2.44±0.05	44.71±0.61	57.08±0.42	0.50±0.01	0.57±0.01
Andenes	3.03±0.05	3.12±0.09	50.80±0.36	62.02±1.01	0.72±0.01	0.82±0.02
Yunguyo	3.41±0.05	3.80±0.05	56.43±1.06	65.80±1.07	0.71±0.00	0.90±0.03

**Anexo 7. Contenido de tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol, mg/kg MS) y carotenoides (luteína y zeaxantina, mg/kg MS) de las harinas de tres genotipos de lupino Andino.**

	$\alpha$ - tocoferol	$\beta$ - tocoferol	$\gamma$ - tocoferol	$\delta$ - tocoferol	Luteína	Zeaxantina
<u>Amargo</u>						
Altagracia	0.51±0.07	1.60±0.50	224.68±1.49	2.81±0.23	1.06±0.01	0.11±0.00
Andenes	0.55±0.04	0.93±0.10	228.32±1.11	1.66±0.18	1.20±0.06	0.09±0.02
Yunguyo	0.61±0.00	0.17±0.16	223.83±14.61	2.23±0.03	1.39±0.12	0.09±0.01
<u>Desamargado</u>						
Altagracia	0.63±0.09	2.72±0.08	275.37±12.60	3.02±0.22	1.04±0.01	0.11±0.01
Andenes	0.66±0.03	1.55±0.22	304.29±0.30	2.37±0.12	1.23±0.01	0.12±0.00
Yunguyo	0.72±0.02	1.95±1.03	362.55±33.36	2.55±0.05	1.33±0.03	0.12±0.01
<u>Extruido</u>						
Altagracia	0.64±0.04	3.35±0.12	275.66±5.71	2.95±0.07	0.76±0.00	0.10±0.02
Andenes	0.68±0.02	2.03±0.02	305.84±8.24	2.73±0.20	1.11±0.02	0.10±0.00
Yunguyo	0.73±0.01	2.38±0.19	354.50±1.36	2.29±0.03	1.24±0.01	0.11±0.01
<u>Bebida secada por aspersión (goma arábiga)</u>						
Altagracia	0.51±0.02	1.25±0.17	162.50±1.23	2.20±0.26	0.45±0.01	0.06±0.00
Andenes	0.51±0.03	1.50±0.07	202.15±2.82	1.97±0.24	0.92±0.01	0.07±0.01
Yunguyo	0.54±0.12	1.73±0.42	243.92±0.41	2.16±0.68	0.80±0.06	0.05±0.01
<u>Bebida secada por aspersión (maltodextrina)</u>						
Altagracia	0.55±0.01	1.50±0.06	169.31±2.63	2.27±0.10	0.44±0.01	0.05±0.01
Andenes	0.54±0.03	1.64±0.04	208.52±0.98	1.86±0.34	0.90±0.07	0.06±0.03
Yunguyo	0.56±0.03	1.89±0.62	257.21±2.08	2.17±0.26	1.01±0.09	0.04±0.01

**Anexo 8. Granos de lupino o tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet).**



**Anexo 9. Granos de lupino desamargado de diferentes variedades.**



**Anexo 10. Preparación de la bebida a partir de los granos de lupino desamargado.**



**Anexo 11. Bebida de lupino.**



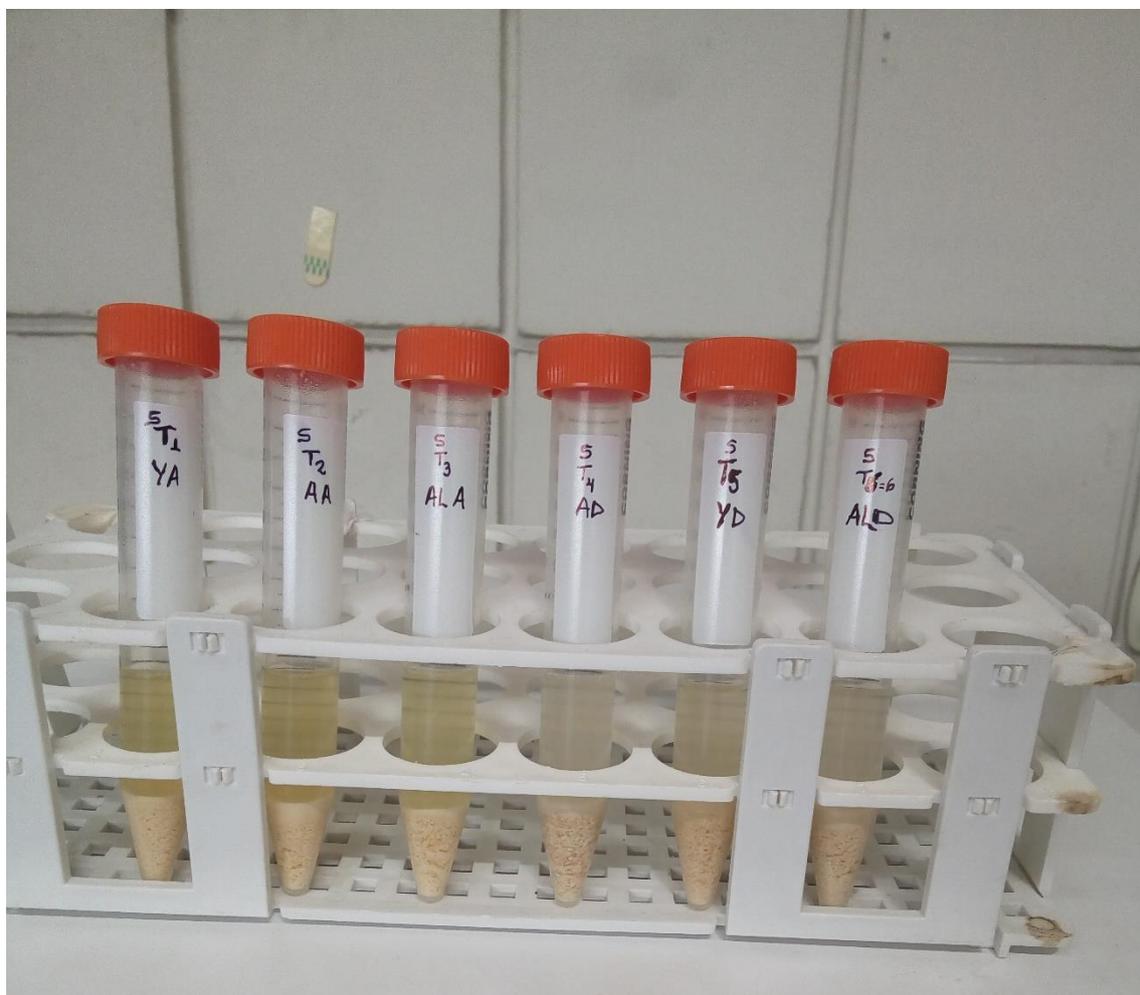
**Anexo 12. Secado por aspersión de la bebida de lupino.**



**Anexo 13. Muestras de lupino amargo, desamargado, extruido y secado por aspersion.**



**Anexo 14. Extracto de las muestras de lupino amargo, desamargado, extruido y secado por aspersión.**



**Anexo 15. Análisis de los componentes funcionales en los laboratorios de la Universidad de Milán – Italia.**



## Anexo 16. Artículo publicado en Cereal Chemistry – Wiley/Indexado en WOS y Scopus.

Received: 4 January 2020 | Revised: 17 April 2020 | Accepted: 19 May 2020

DOI: 10.1002/cche.30303

RESEARCH ARTICLE



# Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): Processing effects on chemical composition, heat damage, and in vitro protein digestibility

Javier S. Córdova-Ramos<sup>1</sup> | Patricia Glorio-Paulet<sup>2</sup> | Felix Camarena<sup>3</sup> | Andrea Brandolini<sup>4</sup> | Alyssa Hidalgo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Administration, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, School of Food Science, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Peru

<sup>2</sup>Food Engineering and Agricultural Products Department, Faculty of Food Industry, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Peru

<sup>3</sup>Programa de Leguminosas, Faculty of Agronomy, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Peru

<sup>4</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – Unità di Ricerca per la Zootecnia e l'Acquacoltura (CREA-ZA), S. Angelo Lodigiano (LO), Italy

<sup>5</sup>Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

### Correspondence

Patricia Glorio-Paulet, Food Engineering and Agricultural Products Department, Faculty of Food Industry, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Av. La Molina s/n, Lima, Peru.  
Email: pgg@lamolina.edu.pe

### Funding information

Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) del Ministerio de Agricultura y Riego, Grant/Award Number: PNIA Project 22-2015-INIA/UPMS/VE; Ministerio de Educación del Perú (MINEDU), Grant/Award Number: Project: CONV-000179-2015-FONDECYT-DE

### Abstract

**Background and objective:** Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) has health benefits with promising possibilities for food industry. The aim of this research was to determine the effect of processing (water debittering, extrusion, and spray-drying) on chemical composition, heat damage and in vitro protein digestibility in Andean lupin.

**Findings:** The processing treatment modified all the parameters while the genotype showed limited effect. The untreated lupins had high protein and lipid content (47.4 and 16.2 g/100 g dry matter). The extruded products showed higher protein content (55.7 g/100 g) and digestibility (68.1%) than the untreated lupins, along with limited heat damage (8.7 mg furosine/100 g protein). Spray-drying led to the lowest protein content (31.8 g/100 g) and, when maltodextrin was used, the highest heat damage (54.1 ± 20.7 mg furosine/100 g protein; 0.60 mg hydroxymethylfurfural/kg; 0.58 mg glycosylisomaltol/kg), but also to the maximum protein digestibility (72.8%–74.0%).

**Conclusions:** The chemical composition of Andean lupin was improved by the technological treatments (debittering, extrusion, and spray-drying) applied. Processing enhanced nutritional value and digestibility, without inducing relevant heat damage.

**Significance and novelty:** Extrusion and spray-drying improve the in vitro protein digestibility of Andean lupin flour causing limited heat damage.

### KEYWORDS

debittering, extrusion, heat damage, *Lupinus mutabilis*, spray-drying



## Efecto del proceso tecnológico sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales del lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) andino

### Effect of technological process on antioxidant capacity and total phenolic content of Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet)

Javier S. Córdova-Ramos<sup>1,\*</sup> ; Patricia Glorio-Paulet<sup>2</sup> ; Alyssa Hidalgo<sup>3</sup> ; Felix Camarena<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Universitaria / Calle Germán Amézcaga 375, Lima, Perú.

<sup>2</sup> Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, Lima, Perú.

<sup>3</sup> Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano, Italy.

<sup>4</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, Lima, Perú.

Received January 26, 2020. Accepted May 9, 2020.

#### Resumen

Se evaluó el efecto del desamargado, la extrusión y el secado por aspersión sobre la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos totales en harinas no desgrasadas y desgrasadas de tres genotipos de lupino andino (Altagraña, Andenes y Yunguyo). El contenido de fenólicos totales (TPC; método Folin-Ciocalteu) y la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS<sup>•+</sup>) se evaluaron por espectrofotometría. Los resultados mostraron que los procesos tecnológicos disminuyeron significativamente ( $p \leq 0,06$ ) antioxidantes y compuestos fenólicos. El lupino amargo (muestra de control) tenía una mayor capacidad de TPC y antioxidante ( $p \leq 0,06$ ) que las muestras procesadas. En muestras no desgrasadas y desgrasadas, el TPC de las muestras procesadas varió entre 0,64 - 1,10 y 0,76 - 1,33 mg de ácido gálico equivalente/g b.s., en muestras no desgrasadas y desgrasadas, respectivamente. La capacidad antioxidante DPPH varió entre 2,87 - 4,10 y 3,12 - 4,73  $\mu\text{mol Trolox/g b.s.}$ , mientras que la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> varió entre 60,66 - 76,66 y 61,63 - 76,88  $\mu\text{mol Trolox/g b.s.}$ , en muestras no desgrasadas y desgrasadas, respectivamente. Por otro lado, los lípidos influyeron negativamente en la cuantificación de TPC; por lo tanto, las muestras desgrasadas tenían un TPC más alto.

**Palabras clave:** capacidad antioxidante; fenoles totales; *L. mutabilis*; lupino Andino; tarwi.

#### Abstract

The effect of debittering, extrusion and spray drying on antioxidant capacity and total phenolic compounds in non-defatted and defatted flours from three Andean lupine genotypes (Altagraña, Andenes, and Yunguyo) was evaluated. Total phenolic content (TPC; Folin-Ciocalteu method) and antioxidant capacity (DPPH and ABTS<sup>•+</sup>) were assessed by spectrophotometry. Results showed that technological processes decreased significantly ( $p \leq 0.06$ ) antioxidants and phenolic compounds. Bitter lupine (control sample) had higher ( $p \leq 0.06$ ) TPC and antioxidant capacity than processed samples. In non-defatted and defatted samples, TPC of processed samples varied between 0.64 - 1.10 and 0.76 - 1.33 mg gallic acid equivalent/g d.m. in non-defatted and defatted samples, respectively. The DPPH antioxidant capacity varied between 2.87 - 4.10 and 3.12 - 4.73  $\mu\text{mol Trolox/g d.m.}$ , while the ABTS<sup>•+</sup> antioxidant capacity ranged between 60.66 - 76.66 and 61.63 - 76.88  $\mu\text{mol Trolox/g d.m.}$  in non-defatted and defatted samples, respectively. On the other hand, lipids negatively influenced the quantification of TPC; therefore, the defatted samples had higher TPC.

**Keywords:** antioxidant capacity; total phenols; *L. mutabilis*; Andean lupine; tarwi.

**Cite this article:** Córdova-Ramos, J.S.; Glorio-Paulet, P.; Hidalgo, A.; Camarena, F. 2020. Efecto del proceso tecnológico sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales del lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) andino. Scientia Agropecuaria 11(2): 157-165.

\* Corresponding author  
E-mail: [joordovar1@untram.edu.pe](mailto:joordovar1@untram.edu.pe) (J.S. Córdova-Ramos).