



Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Optimización de la extracción de los alcaloides quinolizidínicos del tarwi
(*Lupinus mutabilis* Sweet) y su análisis por espectrofotometría y
Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución con detector de arreglo de
diodos (UHPLC-DAD)**

Tesis presentada por:

Peña Esquia, Alessandra Gabriela

ORCID: 0009-0006-3172-1718

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Asesor (a):

Dra. Gálvez Ranilla, Lena

ORCID: 0000-0002-7261-3303

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 25 de Mayo del 2026

Dictamen: 013402-C-EPFyB-2026

Visto el borrador del expediente 013402, presentado por:

2018100922 - PEÑA ESQUIA ALESSANDRA GABRIELA

Titulado:

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS DEL TARWI
(LUPINUS MUTABILIS SWEET) Y SU ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE ARREGLO DE
DIODOS (UHPLC-DAD)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



**45767861 - CHOQUENAIRA QUISPE CELIA
DICTAMINADOR**



OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS DEL TARWI (LUPINUS MUTABILIS SWEET) Y SU ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%	7%	2%	5%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María	3%
	Trabajo del estudiante	
2	repositorio.ucsm.edu.pe	2%
	Fuente de Internet	
3	Giovanna Boschin, Donatella Resta. "Chapter 11-1 Alkaloids Derived from Lysine: Quinolizidine Alkaloids, a Focus on Lupin Alkaloids", Springer Science and Business Media LLC, 2025	1%
	Publicación	
4	pmc.ncbi.nlm.nih.gov	1%
	Fuente de Internet	

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

< 1%

Excluir bibliografía

Apagado

Dedicatoria

A mis padres, Elard y Sandra, quienes han estado en mis aciertos y tropiezos, alcanzar esta meta ha sido posible por el apoyo, la confianza y enseñanzas que depositaron en mí.

A mis abuelitos, Jacinto y Betty, quienes me brindaron no solo su apoyo y amor incondicional, sino también el cariño presente en cada uno de sus cuidados que fueron un aliento constante en toda mi etapa universitaria.

A mi hermano, André, por estar siempre dispuesto a escucharme y compartir conmigo tanto momentos alegres como de adversidades; anhelo verte cumplir todas tus metas y estar ahí para apoyarte.



Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme fortaleza y sabiduría en cada etapa de este camino. En los momentos difíciles fue mi guía y mi refugio, dándome la perseverancia necesaria para seguir adelante y culminar esta meta. A Él encomiendo siempre mis pasos y mis logros.

Expreso mi más profundo agradecimiento a mi asesora PhD. Lena Galvez Ranilla Docente Investigadora del Laboratorio Ciencias de los Alimentos, por la confianza depositada en mí a lo largo de todo este proceso. Su guía constante, el tiempo dedicado y su paciencia me permitieron avanzar con seguridad en mi preparación. Agradezco la oportunidad de haber podido aprender de su experiencia y compromiso profesional, enriqueciendo mi formación personal y académica.

A Jeferson Vilca Alosilla, por su apoyo continuo, conocimientos compartidos y por permitir que este proceso sea más ameno y comprensible.

También agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la UCSM por su disposición para compartir conocimientos y por los momentos compartidos, entre el trabajo y las risas, que permanecerán como un recuerdo imborrable de esta etapa de mi vida.

RESUMEN

El *Lupinus mutabilis* Sweet, conocido popularmente como “tarwi”, es una leguminosa andina reconocida por su alto valor nutricional, sin embargo, ha sido poco estudiado en comparación con otras especies del género *Lupinus*. Esta investigación, de tipo experimental y exploratorio, tuvo como objetivo principal optimizar la extracción de alcaloides quinolizidínicos (AQ) del tarwi y su análisis por espectrofotometría y UHPLC-DAD (Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución con detector de arreglo de diodos). Las semillas de cinco variedades de tarwi (Andenes-TA, Yunguyo-TY, Alta gracia-TAG, Cholo fuerte-TCF, Paton grande-TPG) fueron caracterizadas a nivel físico-morfológico mostrando diferencias significativas en el peso de 100 granos, tamaño y parámetros de color, siendo la variedad TPG la que presentó el mayor peso (29.73 ± 0.46 g), mientras que los parámetros a^* y b^* se asociaron con tonalidades rojizas y amarillentas de las semillas. Se implementaron los métodos de cuantificación de alcaloides quinolizidínicos totales (AQT) convencionales como el volumétrico, el espectrofotométrico y adicionalmente un método basado en una extracción en dos etapas (ácido y alcalino) al cual se le denominó método de Muzquiz adaptado (con detección por espectrofotometría). La aplicación de estos tres métodos permitió definir que el contenido de AQT es mayor cuando la extracción se realiza con tarwi sin desgrasar en comparación con una muestra desgrasada, obteniendo un mayor valor con el método de Muzquiz adaptado (3.94 ± 0.02 g de lupanina/100 g en bs, variedad TA sin desgrasar), respecto a los otros métodos. Las mejores condiciones extracción de AQ con el método de Muzquiz (extracción en dos etapas ácida y alcalina) y con detección por UHPLC-DAD fueron el uso de una proporción peso/volumen de 1/5, como solvente de extracción el ácido tricloroacético (TCA) al 5% y bajo agitación orbital a 200 rpm durante 30 minutos, seguida de una extracción con diclorometano en condiciones alcalinas. Finalmente se evaluaron las 5 variedades comerciales de tarwi aplicando el método de extracción optimizado y con detección por UHPLC-DAD, donde la variedad TY presentó la mayor concentración de AQT (3.41 ± 0.14 g/100 g bs), con la lupanina como compuesto predominante (3.79 ± 0.17 g/100 g bs), seguida por un derivado de lupanina y derivados de esparteína (0.34 ± 0.04 y 0.28 ± 0.004 g/100 g bs, respectivamente). No se observó una correlación directa entre el contenido de AQT y el color de las semillas. Esta investigación constituye la base para el desarrollo de un método de análisis de AQ del tarwi en sistemas de mayor envergadura como por LC-MS, y este método desarrollado podría ser utilizado para la caracterización del tarwi de la diversidad peruana con fines de mejoramiento genético y para explorar potenciales usos de los AQ.

Palabras clave:

Lupinus mutabilis Sweet, alcaloides quinolizidínicos, UHPLC-DAD.



ABSTRACT

Lupinus mutabilis Sweet, popularly known as "tarwi," is an Andean legume recognized for its high nutritional value; however, it has been little studied compared to other species of the genus *Lupinus*. This experimental and exploratory research aimed to optimize the extraction of quinolizidine alkaloids (QAs) from tarwi and their analysis by spectrophotometry and UHPLC-DAD (Ultra-High Performance Liquid Chromatography with diode array detector). The seeds of five tarwi varieties (Andenes-TA, Yunguyo-TY, Alta Gracia-TAG, Cholo Fuerte-TCF, and Paton Grande-TPG) were characterized at the physical-morphological level, showing significant differences in 100-grain weight, size, and color parameters. The TPG variety exhibited the greatest weight (29.73 ± 0.46 g), while the a^* and b^* parameters were associated with reddish and yellowish tones in the seeds. Conventional methods for quantifying total quinolizidine alkaloids (TQA) were implemented, including volumetric and spectrophotometric methods, as well as a two-stage extraction method (acid and alkaline) called the adapted Muzquiz method (with spectrophotometric detection). The application of these three methods revealed that TQA content is higher when the extraction is performed with undefatted tarwi compared to a defatted sample, with the adapted Muzquiz method yielding the highest value (3.94 ± 0.02 g lupanine/100 g dry weight, undefatted TA variety) compared to the other methods. The best conditions for AQ extraction using the Muzquiz method (two-stage acid and alkaline extraction) and detection by UHPLC-DAD were the use of a weight/volume ratio of 1/5, trichloroacetic acid (TCA) at 5% as the extraction solvent and under orbital shaking at 200 rpm for 30 minutes, followed by extraction with dichloromethane under alkaline conditions. Finally, the five commercial varieties of tarwi were evaluated using the optimized extraction method and UHPLC-DAD detection. The TY variety showed the highest concentration of total AQT (3.41 ± 0.14 g/100 g dry weight), with lupanine as the predominant compound (3.79 ± 0.17 g/100 g dry weight), followed by a lupanine derivative and sparteine derivatives (0.34 ± 0.04 and 0.28 ± 0.004 g/100 g dry weight, respectively). No direct correlation was observed between AQT content and seed color. This research provides the basis for developing a method for analyzing tarwi AQ in larger-scale systems such as LC-MS. This developed method could be used to characterize the diversity of Peruvian tarwi for genetic improvement purposes and to explore potential uses of AQ.

Keywords:

Lupinus mutabilis Sweet, quinolizidine alkaloids, UHPLCDAD.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVOS..... 3

HIPÓTESIS 4

CAPÍTULO I..... 5

1. MARCO TEÓRICO 6

1.1. Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) 6

1.1.1. Generalidades 6

1.1.2. Clasificación taxonómica 7

1.1.3. Descripción botánica 7

1.1.4. Composición química del grano..... 9

1.1.5. Situación actual del tarwi 11

1.2. Alcaloides 11

1.2.1. Generalidades 11

1.2.2. Propiedades químicas 12

1.3. Alcaloides quinolizidínicos 13

1.3.1. Principales alcaloides quinolizidínicos del *Lupinus mutabilis* Sweet..... 14

1.3.2. Toxicidad de los alcaloides quinolizidínicos..... 16

1.3.3. Propiedades farmacológicas de los AQ..... 17

1.4. Métodos de extracción de alcaloides quinolizidínicos 18

1.4.1. Métodos de extracción..... 18

1.5. Métodos de cuantificación de alcaloides quinolizidínicos 19

1.5.1. Método volumétrico: Ácido-Base 19

1.5.2. Método por espectrofotometría UV-visible 20

1.5.3. Métodos cromatográficos 21

CAPÍTULO II 23

2. MATERIALES Y MÉTODOS..... 24

2.1. Lugar de ejecución..... 24

2.2. Materiales 24

2.2.1. Material Biológico.....	24
2.2.2. Reactivos químicos	26
2.2.4. Materiales de laboratorio.....	26
2.3. Métodos de análisis	28
2.3.1. Análisis de humedad	28
2.3.2. Análisis del color de las semillas	28
2.3.3. Caracterización física de las semillas de tarwi	29
2.3.4. Preparación de las muestras de tarwi para el análisis de alcaloides quinolizidínicos (AQ)	29
2.3.5. Extracción y análisis del contenido de alcaloides quinolizidínicos totales (AQT) por métodos convencionales.....	30
2.3.6. Análisis del contenido y perfil de los AQ por UHPLC-DAD.....	33
2.4. Metodología experimental.....	35
A) Caracterización físico-morfológica de las semillas de tarwi.....	37
B) Implementación de los métodos convencionales volumétrico y espectrofotométrico y evaluación del efecto del desgrasado o no desgrasado del tarwi.....	37
D) Análisis del contenido de alcaloides en muestras comerciales de tarwi	39
2.5. Análisis estadístico	40
CAPÍTULO III	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1. Caracterización física de las variedades comerciales de tarwi	42
3.1.1. Análisis del color.....	42
3.1.2. Análisis de las características morfológicas y peso de 100 granos	44
3.2. Implementación de los métodos convencionales volumétrico y espectrofotométrico para el análisis del contenido de AQ.....	46
3.3. Determinación de los mejores parámetros de extracción según el Método de Muzquiz.....	50
3.3.1. Influencia de la proporción P/V en la eficiencia de extracción.....	50
3.3.2. Influencia del tipo de ácido en la eficiencia de extracción.....	51
3.3.3. Influencia del tipo de homogenización	52
3.4. Análisis del contenido y perfil de AQ por UHPLC-DAD en cinco variedades de tarwi.....	56

3.4.1. Contenido de alcaloides quinolizidínicos totales	56
3.4.2. Análisis del contenido y perfil de AQ por UHPLC-DAD	60
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de algunas especies de lupino (g/100 g base seca, bs).....	9
Tabla 2. Variedades de tarwi andino (<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet).....	25
Tabla 3. Gradiente de elución para el análisis de lupanina, esparteína y compuestos derivados por UHPLC-DAD	34
Tabla 4. Diseño experimental para la caracterización físico-morfológica de las semillas de tarwi.....	37
Tabla 5. Diseño experimental para la evaluación del efecto del desgrasado del tarwi utilizando métodos de análisis para AQT convencionales.....	37
Tabla 6. Diseño experimental para optimizar los parámetros del proceso de extracción según la metodología de Muzquiz.....	39
Tabla 7. Diseño experimental para el análisis del contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ) para cada variedad de tarwi implementando varios métodos.....	40
Tabla 8. Cromatogramas, tiempos de retención, compuesto identificado y longitud de onda de máxima absorción de los espectros de compuestos detectados en la variedad Yunguyo presentadas en las Figuras 13 y 14.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tarwi andino	7
Figura 2. Formación de nódulos en las raíces de la especie <i>Lupinus mutabilis</i>	8
Figura 3. Partes principales de la semilla de tarwi	8
Figura 4. Variación morfológica de las semillas del tarwi andino	9
Figura 5. Estructuras de algunos	12
Figura 6. Estructuras de algunos pseudoalcaloides	12
Figura 7. Biosíntesis de las quinolizidinas	13
Figura 8. Clasificación de los alcaloides quinolizidínicos	14
Figura 9. Estructura molecular de la lupanina.....	15
Figura 10. Estructura molecular de la esparteína	15
Figura 11. Estructura molecular de 13-hidroxilupanina.....	16
Figura 12. Diagrama de flujo de procesamiento de la muestra hasta la obtención de AQT.....	36
Figura 13: Análisis del color en la escala CIELab* de 5 variedades comerciales de tarwi.....	43
Figura 14. Características morfológicas y peso de 100 granos de semillas de 5 variedades de tarwi.....	45
Figura 15. Concentración (g lupanina/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales y residuales comparando tres métodos de extracción.	48
Figura 16 . Concentración de alcaloides quinolizidínicos (g de AQ/ 100 g bs según la proporción el P/V cuantificado UHPLC-DAD.	50
Figura 17. Concentración (g de AQ/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales según el tipo de ácido cuantificado por UHPLC-DAD.....	52

Figura 18. Concentración (g AQ/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por Ultraturrax cuantificado por UHPLC-DAD	53
Figura 19. Concentración (g AQ / 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por agitación orbital, cuantificado por UHPLC-DAD.....	54
Figura 20. Concentración (g AQ / 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por baño de ultrasonido, cuantificado por UHPLC-DAD	55
Figura 21. Concentración de alcaloides quinolizidínicos totales en g/100 g bs comparando las 5 variedades de tarwi obtenidos mediante dos métodos de cuantificación	58
Figura 22. Concentración de alcaloides quinolizidínicos totales en g/100 g bs comparando los métodos de cuantificación de las 5 variedades de tarwi	59
Figura 23. Perfil cromatográfico a 205 nm de Lupanina (1) y derivado de Lupanina (2) de la variedad Tarwi Yunguyo (A) y estándar de Lupanina a 250 ppm (B).	62
Figura 24. Perfil cromatográfico a 305 nm de derivados de Esparteína (1A)(2A)(3) de la variedad Tarwi Yunguyo (A), y estándar de Esparteína 500 ppm (B).	63
Figura 25. Concentración de alcaloides quinolizidínicos en g/100 g bs de 5 variedades de tarwi.....	65

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Registro de material biológico de tarwi y sus derivados	77
Anexo 2. Resultado de la evaluación del efecto del desgrasado sobre el contenido de AQT del tarwi.....	85
Anexo 3. Implementación del método de análisis de AQT por el método volumétrico y determinación del número de extracciones de las muestras de tarwi variedad tarwi andenes	86
Anexo 4. Preparación de soluciones y reactivos para el análisis de AQT	88
Anexo 5. Barrido espectral para la determinación de la longitud de onda de análisis por el método espectrofotométrico	92
Anexo 6. Determinación de las condiciones de separación cromatográfica por UHPLC-DAD.....	93
Anexo 7. Identificación de las longitudes de máxima absorción de los estándares de lupanina y esparteína	105
Anexo 8. Construcción de la curva de calibración aplicada para la optimización de parámetros de extracción usando la columna C18	108
Anexo 9. Construcción de la curva de calibración aplicada para la determinación de AQ de las variedades de tarwi usando la columna EVO C18.....	110
Anexo 10. Tablas estadísticas	112
Anexo 11. Análisis estadísticos del análisis óptico de las cinco variedades de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	117
Anexo 12. Análisis estadísticos de las características morfológicas de cinco variedades de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	119
Anexo 13. Análisis estadísticos según los métodos de cuantificación y tipo de muestra (MSD Y MD).....	121

Anexo 14. Análisis estadísticos de las proporciones p/v evaluadas por UHPLC-DAD	124
Anexo 15. Análisis estadísticos del tipo de ácido evaluado por UHPLC-DAD	125
Anexo 16. Análisis estadísticos para la homogenización por ultraturrax	127
Anexo 17. Análisis estadísticos para la homogenización por agitador orbital.....	129
Anexo 18. Análisis estadísticos para la homogenización por baño ultrasónico.....	131
Anexo 19. Análisis estadísticos para la evaluación del método según las variedades analizadas	132
Anexo 20. Análisis estadísticos para la evaluación de las variedades según el método analizado.....	135
Anexo 21. Análisis estadísticos para la evaluación del método según las variedades analizadas	137
Anexo 22. Análisis estadísticos para la evaluación de las variedades según el método analizado.....	139
Anexo 23. Análisis estadísticos para la evaluación de las variedades por UHPLC- DAD	140

INTRODUCCIÓN

El tarwi andino (*Lupinus mutabilis* Sweet), se ha destacado por ser un alimento esencial para los pueblos originarios de la sierra desde tiempos pre-hispánicos (1). El tarwi es una leguminosa con gran valor nutricional debido a su contenido de aminoácidos esenciales, vitaminas y de minerales como el hierro, zinc, calcio y fósforo; además de presentar un alto contenido proteico en comparación con la quinua y la soya según lo reportado por el Instituto Nacional de Salud (2). A pesar de la importancia cultural para los pueblos indígenas y su aporte nutricional, el tarwi sigue siendo un cultivo subutilizado a diferencia de otras leguminosas más comerciales, por tal motivo, las investigaciones científicas para la especie *Lupinus mutabilis* son muy escasas, en comparación con otras especies del mismo género (*L. albus* y *L. angustifolius*) (3).

Las semillas de tarwi de la especie *Lupinus mutabilis* presentan un alto contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ), entre los más destacados se encuentran la lupanina, esparteína y 13-hidroxilupanina (4). La concentración de AQ varía considerablemente, alcanzando niveles entre 0.2 a 4.5% como alcaloides totales en base seca (bs) dependiendo de las diferentes condiciones de cultivo en que se encuentren, el almacenamiento de las semillas, entre otros factores (5,6); se han reportado estudios que demuestran que el consumo elevado de estos metabolitos secundarios provocan daños a nivel del sistema nervioso central (SNC) (7); por tal motivo, las concentraciones permitidas en términos dietéticos no deben superar los 200 mg/kg según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (7) y según la Norma Técnica Peruana (NTP) (8,9). Sin embargo, también se ha observado que estos compuestos tienen la capacidad de actuar como repelentes naturales de plagas (10,11) y presentan ciertas propiedades farmacológicas. Se ha reportado que la lupanina tiene una capacidad antihiperlipidémica en modelos *in vitro* (12), mientras que la esparteína presenta propiedades antiarrítmicas (13), anticonvulsivantes (14) y antimicrobianas (15).

Aunque se reconozcan sus propiedades farmacológicas, existe gran variabilidad en diferentes parámetros de extracción y cuantificación según diversas publicaciones, por lo que existe la necesidad de realizar estudios acerca de los métodos más adecuados para la extracción, identificación y cuantificación de estos metabolitos presentes en la especie *Lupinus mutabilis* Sweet. Por lo anterior, este trabajo de investigación tuvo como objetivo optimizar una metodología de extracción que maximice la concentración de los alcaloides quinolizidínicos totales del tarwi, de tal manera que puedan ser cuantificados por métodos instrumentales como

espectrofotometría y cromatografía líquida de Ultra-Alta resolución con detector de arreglo de diodos (UHPLC-DAD).



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Optimizar la extracción de los alcaloides quinolizidínicos del tarwi y su análisis por espectrofotometría y cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de arreglo de diodos (UHPLC-DAD)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar las semillas de tarwi de 5 variedades en función a sus propiedades físicas como sus dimensiones, su color y peso de 100 granos.
2. Implementar el método convencional volumétrico y el método por espectrofotometría para la determinación de alcaloides totales del tarwi con fines comparativos.
3. Determinar los mejores parámetros de extracción que maximicen la cantidad de alcaloides quinolizidínicos (AQ) del tarwi según el Método de Muzquiz para ser cuantificados con el método de detección seleccionado.
4. Cuantificar el contenido total y el perfil de los AQ de 5 variedades de tarwi por Cromatografía Líquida de Ultra-Alta resolución con detector de arreglo de diodos (UHPLC-DAD) aplicando el método de extracción óptimo.

HIPÓTESIS

“Dado que los alcaloides quinolizidínicos (AQ) son compuestos considerados como subproductos generados durante el procesamiento del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y teniendo en cuenta que existe evidencia científica acerca de sus propiedades farmacológicas beneficiosas para la salud es factible optimizar el proceso de extracción, y cuantificarlos tanto por espectrofotometría como por UHPLC-DAD en 5 variedades comerciales de tarwi.”





1. MARCO TEÓRICO

1.1. Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)

1.1.1. Generalidades

Lupinus mutabilis Sweet, es una leguminosa andina conocida principalmente con el nombre de “tarwi”, adquiere distintos nombres como chocho, lupino o tauri dependiendo de la región en donde se cultive (4,10), su cultivo se encuentra estrechamente ligado a condiciones climáticas específicas, creciendo entre los 2000 y 3800 metros de altura (16). En Europa, el tarwi es conocido coloquialmente como lupino del “viejo mundo” y entre las especies estudiadas se incluyen el *L. albus*, *L. luteus*, y *L. angustifolius* (11).

El tarwi es considerado un excelente alimento proteico llegando a alcanzar concentraciones de hasta un 50%, niveles mayores comparado con ciertas variedades de quinua y soya, las cuales generalmente presentan un 14% y 34%, respectivamente (2); por tal motivo, esta leguminosa representa una alternativa complementaria frente a la proteína animal. Asimismo, se caracteriza por contener compuestos con actividad biológica como son los flavonoides, tocoferoles, carotenoides, entre otros. La fibra dietética, compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectina, se concentra en la cáscara de las semillas de tarwi, desempeñando un papel crucial en la salud digestiva (11). A pesar de los beneficios nutricionales y de la capacidad que presenta para adaptarse a diversas condiciones climáticas, su consumo se encuentra restringido por el alto contenido de alcaloides que presentan las semillas. Como consecuencia de ello, la investigación científica acerca de los alcaloides quinolizidínicos del tarwi peruano (*Lupinus mutabilis* Sweet) es muy escasa en comparación con otras especies, tales como *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius* (3) que son mayormente estudiados en países europeos o incluso en Ecuador (17,18).

Los alcaloides quinolizidínicos son compuestos químicos heterocíclicos nitrogenados presentes en diversas plantas, siendo la lupanina el alcaloide presente en mayor concentración, seguido por la esparteína e hidroxilupanina, encontrándose otros alcaloides en menor concentración dependiendo de la variedad (4). La mayoría de estos alcaloides presentan propiedades tóxicas para los seres humanos (5); a pesar de su toxicidad, existe evidencia científica que reporta que los alcaloides podrían tener propiedades beneficiosas para la salud (19). Asimismo, estos metabolitos secundarios contribuyen significativamente a las plantas, ya que se comportan como insecticidas naturales, evitando también la depredación por herbívoros (10,11).

1.1.2. Clasificación taxonómica

Según la clasificación taxonómica propuesta por Garay Canales et al. (20), el tarwi se encuentra categorizado de la siguiente manera:

Nombre común: Tarwi, Chocho

Nombre científico: *Lupinus mutabilis* Sweet

División: Espermatofitos

Sub-división: Angiosperma

Clase: Dicotiledóneas

Sub-Clase: Arquidamideas

Orden: Rosales

Familia: Papilionoideas

Sub-familia: Genisteas

Género: *Lupinus*

Especie: *mutabilis*

1.1.3. Descripción botánica

El tarwi se caracteriza por ser una especie que crece anualmente logrando alcanzar una altura de 0.8 m hasta 2 m dependiendo de la región de su cultivo, además suelen ser resistentes a cambios climáticos siendo esta una característica fundamental para su adaptación y manejo agrícola (21).

Figura 1. Tarwi andino



*Adaptado de Prins, U et al. (2019) (22).

La raíz se caracteriza por ser pivotante, presenta ramificaciones, una estructura leñosa y logra alcanzar una profundidad de hasta 2 m (16,23). Además, como resultado de la simbiosis entre esta raíz y la bacteria del género *Rhizobium lupini*, permiten fijar el nitrógeno atmosférico en forma de nódulos que luego pueden ser utilizados en el crecimiento de otros cultivos

específicos, promoviendo así las buenas prácticas agrícolas y mejorando la sostenibilidad ambiental (1,16).

Figura 2. Formación de nódulos en las raíces de la especie *Lupinus mutabilis*



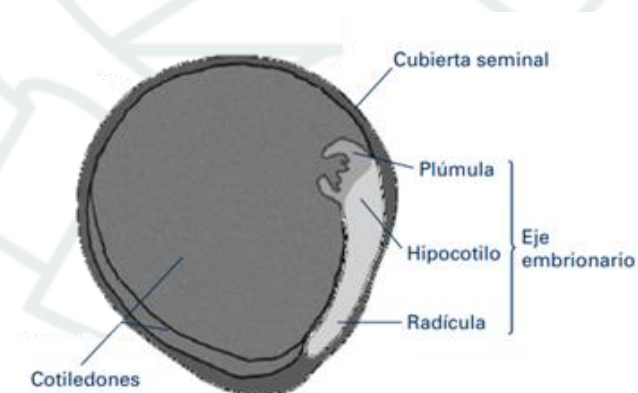
*Adaptado de Taco Taype, N et al. (2024) (24).

Con lo que respecta a su tallo, este es grueso, liso y semi-leñoso logrando alcanzar una altura de hasta 1.80 m, presenta una forma cilíndrica ligeramente aplanada, y su color varía de verde pálido a verde oscuro (21).

Las hojas de tarwi se caracterizan por su forma ovalada o lanceolada y está compuesta por 5 a 12 folíolos, su color abarca desde tonos amarillos verdosos a verdes oscuros (25). Sus flores suelen ser pequeñas, miden de 1 a 2 cm, presentando una variedad de colores entre azul, púrpura, amarillas, blancas o hasta incluso rosadas (26).

Las semillas están compuestas principalmente por tres partes: los cotiledones, que actúan como reserva de nutrientes; el eje embrionario, que representa el óvulo fecundado; y la cubierta seminal, que brinda protección y varía en forma, apariencia y textura (27).

Figura 3. Partes principales de la semilla de tarwi

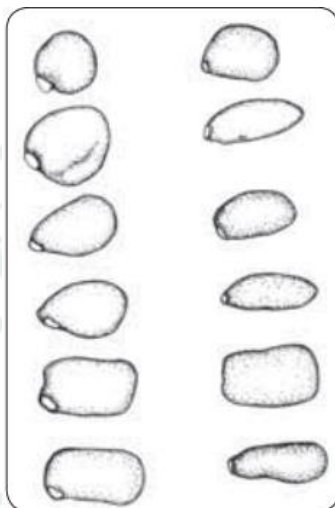


*Adaptado de Matilla, Á. J. (2008) (28).

Su forma es diversa, algunas pueden ser elipsoidales, lenticulares o redondeadas y otras presentan bordes más definidos con una forma semi cuadrada (16), con respecto al color de las

semillas se observa una amplia variedad desde tonalidades blanquecinas, grisáceas o marrones (26).

Figura 4. Variación morfológica de las semillas del tarwi andino



*Adaptado de Tapia, M. E. (2007) (26).

1.1.4. Composición química del grano

Se ha reportado que existen diversas variedades de este grano, por lo que existe una alta variabilidad en su composición química debido a las variaciones genéticas y a las condiciones de su entorno de cultivo (29).

1.1.4.1. Composición química proximal

En la Tabla 1 se muestra la concentración de compuestos químicos con valor nutricional de ciertas especies del tarwi, estos varían según los estudios realizados debido al genotipo estudiado y a la zona de cultivo de la muestra obtenida.

Tabla 1. Composición química de algunas especies de lupino (g/100 g base seca, bs)

Compuestos	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	<i>Lupinus mutabilis</i>	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>
Proteína	44.3	40.87	32.20	23.90
Lípidos	16.5	16.12	9.52	7.40
Carbohidratos	28.2	29.45	49.68	57.10
Fibra	7.1	5.2*	8.9*	5.15*
Cenizas	3.3	3.58	3.50	3.90
Origen	Perú	Perú	Francia/Polonia	Bulgaria
Referencia	(4)	(19,30)	(19,31,32)	(33)

*Elaboración propia. Valor extraído de Carvajal-Larenas et al (19).

Se puede observar que el contenido de proteínas en la especie “*mutabilis*” es mayor en comparación con las otras especies (6,34). Sin embargo, se ha reportado que las semillas de la especie *Lupinus mutabilis* que fueron cultivadas en Polonia presentaron mayor cantidad de proteínas (44.70 % en bs) (11) en comparación con el que fue cultivado en Perú (30); posiblemente esta variación se deba a factores genéticos, agroclimáticos u otros. La especie *Lupinus mutabilis* Sweet se destaca por su mayor contenido promedio de aminoácidos esenciales, destacando la arginina, leucina y lisina con valores de 11.08%, 7.84% y 6.65% (g/100 g de proteína), respectivamente, del contenido total de proteína (35). Sin embargo, es importante considerar que el tarwi presenta deficiencia en metionina (0.8 % del contenido de proteína) (19). Por tal motivo, se hace necesario complementar con otros cereales ricos en metionina para lograr una buena calidad biológica (36).

La cantidad de lípidos presentes en las semillas de la especie *Lupinus mutabilis* oscila entre los 15.42% – 16.12%, encontrándose principalmente en forma de triglicéridos; siendo el más alto de todas las especies de lupino con importancia agrícola (11,30); mientras que la especie *L. albus* y *L. angustifolius* muestran una cantidad de 11.50% y 7.40%, respectivamente. Los carbohidratos están presentes en concentraciones importantes en el tarwi; sin embargo, la especie *L. angustifolius* presenta una mayor cantidad (57.10%) (33).

Además de contener proteínas y lípidos, el tarwi se caracteriza por contener cantidades relevantes de micro y macrominerales como son el hierro (Fe), zinc (Zn), calcio (Ca), magnesio (Mg) y fósforo (P) (presente en los cotiledones de la semilla) (37). El Ca es el mineral que se presenta en mayor cantidad (147 mg/100 g bs) en comparación con los otros minerales, y se encuentra presente principalmente en la cáscara del grano (37,38), por ello es crucial tener en cuenta la relación calcio-fósforo en el proceso de desamargado, debido a que se ha evidenciado un aumento en la concentración de calcio y una disminución en el contenido de fósforo comprometiendo el valor nutricional de las semillas (19).

Las semillas del tarwi también presentan una variedad de metabolitos bioactivos como tocoferoles (103 mg/kg bs), carotenoides (1.17 a 1.48 mg/kg) (39) y compuestos fenólicos con un gran potencial antioxidante para la salud (11).

En el estudio realizado por Brandolini et al. (39), se reportaron compuestos fenólicos derivados de diosmina, ácido cinámico, ácido 2,4 hidroxibenzoico, ácido vanílico, derivados de tirosol, derivados de ácido m-hidroxibenzoico y ácido p-hidroxibenzoico. Por otro lado, también se identificaron isoflavonas principalmente la genístenina, (1280 – 1375 mg/kg bs) (39); la cual presenta propiedades antitrombóticas (40).

1.1.5. Situación actual del tarwi

El tarwi se ha convertido en una planta de interés biológico por su alto contenido proteico (16). Su cultivo se extiende desde Ecuador, Perú, Bolivia hasta Chile bajo diferentes sistemas de producción. En el caso del Perú, su producción se distribuye en varias regiones de Perú, donde resalta principalmente La Libertad, Cuzco, Apurímac y Puno (41). Según los reportes del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI), se observó un aumento gradual en los años 2017-2021, alcanzando su punto máximo en año 2018 con un incremento del 19.3%. Sin embargo, este crecimiento no fue tan significativo en comparación con otros países durante estos últimos cuatro años (41).

1.2. Alcaloides

1.2.1. Generalidades

Los alcaloides son metabolitos secundarios que poseen en su estructura átomos de nitrógeno formando un anillo heterocíclico, estos derivan de la biosíntesis de aminoácidos, su distribución suele ser restringida y a dosis permitidas o mínimas, presentan propiedades beneficiosas para la salud (42).

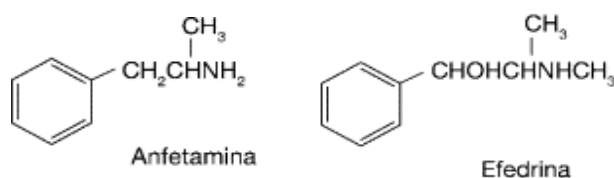
Son compuestos que se encuentran naturalmente en forma de sales en ciertos grupos de plantas y su concentración depende de la parte de la planta estudiada y la mayoría se caracterizan por ser tóxicos (42,43). Algunas de las características generales de los alcaloides son:

- Son compuestos estructuralmente complejos.
- Se sintetizan a partir de aminoácidos
- Sustancias nitrogenadas heterocíclicas.
- Son compuestos con carácter básico
- Presentan actividad farmacológica dependiente de la dosis.

Aquellos que cumplen con las características generales son denominados alcaloides verdaderos o propiamente dichos. Sin embargo, existen otros grupos de alcaloides (protoalcaloides y pseudoalcaloides) que presentan una o varias excepciones con respecto a las características mencionadas (43).

Los protoalcaloides son considerados aminas simples debido a que el nitrógeno no se encuentra ciclado (44).

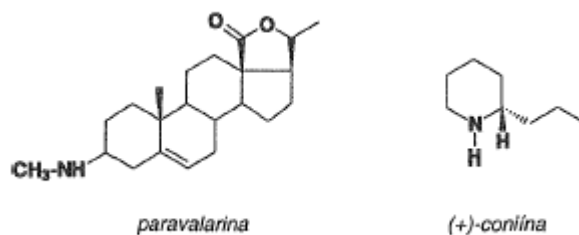
Figura 5. Estructuras de algunos



*Adaptado de Robledo, P. (2008) (45).

Los pseudoalcaloides cumplen con las características generales, sin embargo, en su síntesis no intervienen los aminoácidos, sino que se forman a partir de isoprenos tomando el nombre de alcaloides terpénicos (43).

Figura 6. Estructuras de algunos pseudoalcaloides



*Adaptado de Bruneton, J. (2001) (42).

1.2.2. Propiedades químicas

Los alcaloides no oxigenados se caracterizan por ser volátiles y líquidos a temperatura ambiente; mientras que, los alcaloides oxigenados son incoloros, blancos y sólidos cristalinos (42). La mayoría de los alcaloides presentan actividad óptica por la presencia de un carbono asimétrico en su estructura, por otro lado, la presencia de anillos aromáticos permite absorber radiación UV (44).

El carácter básico de los alcaloides depende principalmente de su configuración molecular y de la disposición de ciertos grupos funcionales. En la mayoría de los casos, el nitrógeno actúa como un sitio activo capaz de aceptar protones en medios ácidos, facilitando la formación de sales, esta propiedad puede potenciarse o disminuir según los grupos presentes. Sin embargo, cuando se encuentran grupos cercanos capaces de donar electrones incrementa la distribución electrónica sobre el átomo de nitrógeno, haciendo que el alcaloide se comporte de manera más básica. Por el contrario, ciertos alcaloides presentan una respuesta neutra, ya que contienen grupos que actúan como aceptores de electrones, provocando una deslocalización de los electrones del nitrógeno, lo que impide su participación en la formación de sales (44). Los alcaloides que se encuentran en forma de sales o se encuentran en un medio con un pH ácido

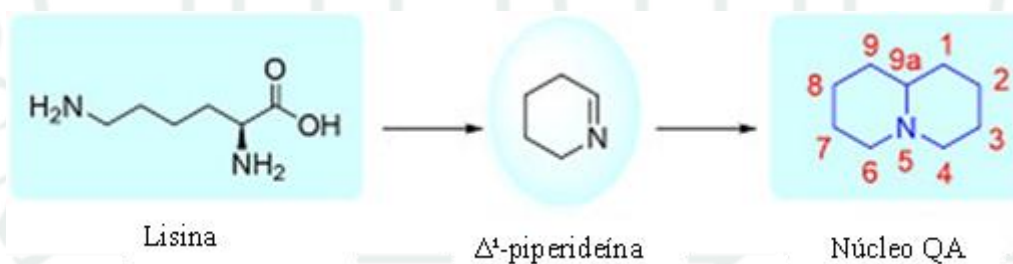
(protonados) son solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos apolares, a diferencia de los alcaloides que se encuentran en su forma libre o en medios con un pH básico que son solubles en solventes orgánicos apolares como el diclorometano, cloroformo, éter, entre otros (43).

1.3. Alcaloides quinolizidínicos

Los alcaloides quinolizidínicos (AQ) presentes en el lupino cumplen funciones importantes como reservas de nitrógeno y desempeñan un papel fundamental contra patógenos, insectos y herbívoros (46). Se reporta que la especie *Lupinus mutabilis* contiene mayor cantidad alcaloides, habitualmente alrededor del 3%, sin embargo, el *Lupinus mutabilis* Sweet puede alcanzar valores mayores a 4% en alcaloides totales (6).

Los AQ contienen un centro quinolizidínico y se biosintetizan a partir de la lisina, la cual es transformada a cadaverina (metabolito intermedio) por acción de la enzima lisina descarboxilasa (LDC); luego este metabolito intermedio pasa por un proceso de desaminación oxidativa mediante la enzima cobre aminoxidasa (CuAO) para formar así al compuesto 5-aminopentanal que posteriormente sufre una ciclación espontánea a Δ^1 -piperideína como un nuevo intermedio (1,47).

Figura 7. Biosíntesis de las quinolizidinas



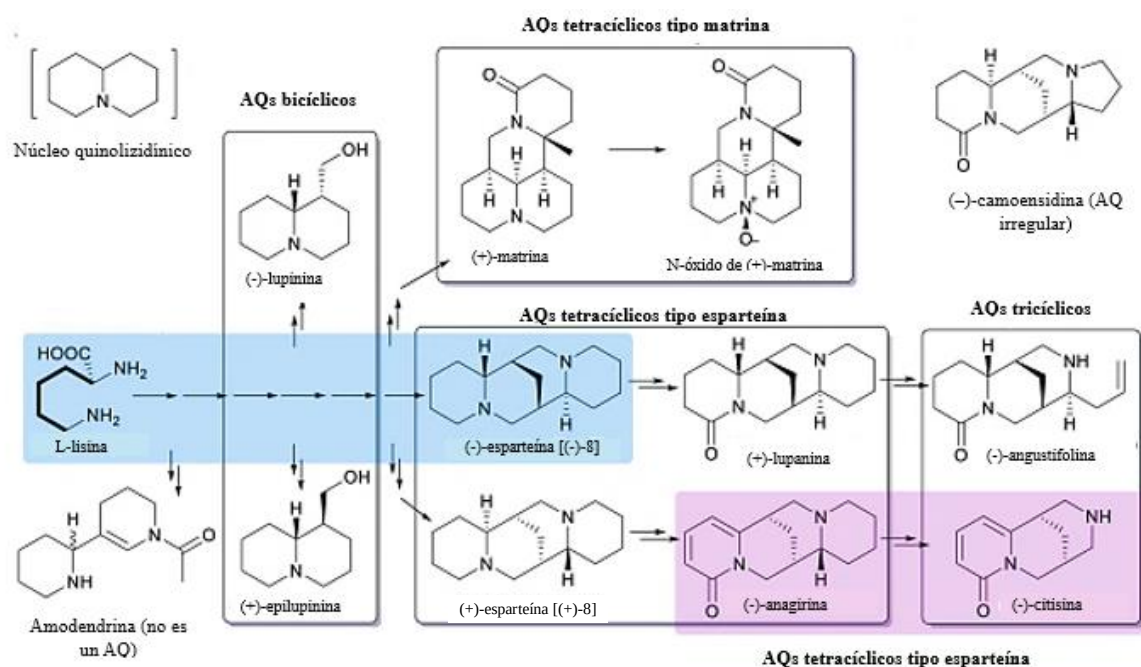
*Adaptado de Zhang, J. et al. (2022) (47).

La clasificación de los AQ (Figura 8) está relacionada al número de anillos unidos presentes en su estructura, de tal manera, estos pueden ser bicíclicos (lupinina y epilupinina), tricíclicos (angustifolina y citisina) o tetracíclicos (matrine, esparteína, lupanina, anagirina) (48).

En relación con la variabilidad en la composición de alcaloides entre las principales especies de lupino, se reporta la lupanina como el principal alcaloide. No obstante, se han identificado otros compuestos además de la lupanina en la especie *Lupinus mutabilis*, incluyendo la 13-hidroxlupanina, esparteína y otros componentes en menor concentración como la tetrahidrorhombifolina, 4-hidroxlupanina, angustifolina y ammodendrina (19). Esta

amplia diversidad química sugiere que la especie presenta una composición química compleja, por ende, es importante profundizar la comprensión de esta complejidad para obtener una visión más completa de los compuestos.

Figura 8. Clasificación de los alcaloides quinolizidínicos



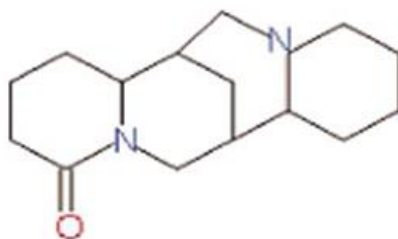
*Adaptado de Mancinotti, D. et al (2022) (48).

1.3.1. Principales alcaloides quinolizidínicos del *Lupinus mutabilis* Sweet

1.3.1.1. Lupanina

La lupanina (Figura 9) es el AQ tetracíclico derivado de la esparteína que se encuentra en mayor concentración en *Lupinus mutabilis* (46-84.5%) respecto a los AQ totales (49), presenta un peso molecular de 248.36 g/mol (50) y es soluble en agua, cloroformo, éter, alcohol e insoluble en éter de petróleo (19). Este alcaloide ha generado una atención considerable en el ámbito biotecnológico, debido a que puede ser empleado como materia prima para la semi-síntesis de varios compuestos de valor agregado (51). Sin embargo, la lupanina a ciertas concentraciones es neurotóxica y se presenta en la naturaleza como un racemato de D-(+)-lupanina y L-(-)-lupanina, lo que implica el desarrollo de procesos de separación que permitan recuperar los enantiómeros en forma pura y permitan el uso de cada compuesto para la producción de moléculas finas específicas (51).

Figura 9. Estructura molecular de la lupanina



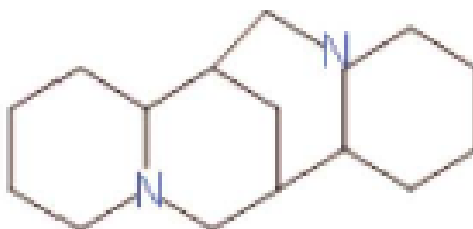
*Adaptado de Carvajal-Larenas, F. E.(2016) **(19)**.

1.3.1.2. **Esparteína**

La esparteína [(-)-esparteína] (Figura 10) es un alcaloide tetracíclico con 4 átomos de carbono (C6, C7, C9 y C11) asimétricos estableciendo formas estereoisoméricas. (14,48). Su concentración en la especie *Lupinus* es de 6.6 a 19.1% respecto a los AQ totales, siendo menor a la lupanina (19). El contenido de esparteína depende de la variedad, el hábitat, la fenología, el órgano de la planta y las condiciones climáticas. Las propiedades químicas y físicas dependerán de su forma enantiomérica en la que se encuentre presente, siendo soluble principalmente en agua en su forma pura, mientras que sus formas racémicas pueden ser solubles en agua, etanol y/o cloroformo (14).

Además, este metabolito es empleado en el campo de la síntesis química por su capacidad para quelar el calcio y el magnesio (52) y posee propiedades anticonvulsivas (48). A pesar de sus propiedades, la esparteína no está aprobada por la FDA para uso humano, de tal manera que los productos a base de este metabolito han sido retirados o eliminados del mercado por razones de seguridad o eficacia (52).

Figura 10. Estructura molecular de la esparteína



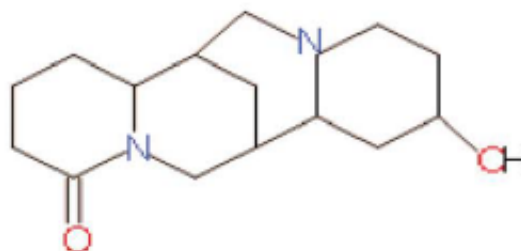
*Adaptado de Carvajal-Larenas, F. E.(2016) **(19)**.

1.3.1.3. **13-Hidroxilupanina**

La 13-hidroxilupanina (Figura 11) no ha sido muy estudiada en la especie *Lupinus mutabilis*, a pesar de ello se reporta concentraciones en un rango de 1.6% a 14.9% respecto al

total de AQ (36). Sin embargo, las especies de *L. angustifolius* y *L. albus* presentan más información científica acerca de sus propiedades debido a que este compuesto se encuentra en mayor concentración (24 - 45% del total de AQ) (36). Los perfiles de actividad farmacológica del metabolito 13-hidroxilupanina son similares a los de la esparteína (53).

Figura 11. Estructura molecular de 13-hidroxilupanina



*Adaptado de Carvajal-Larenas, F. E.(2016) (19).3

1.3.2. Toxicidad de los alcaloides quinolizidínicos

El lupino contiene diferentes componentes antinutritivos como saponinas, taninos y flavonoides en concentraciones variables, así como sustancias amargas naturales como los AQ (54), su presencia en el grano crudo le confiere un sabor amargo siendo inapropiado para el consumo directo en la dieta humana. En consecuencia, organizaciones europeas han establecido que los niveles de alcaloides presentes en el grano y sus derivados no deben exceder el 0.02% (9) siendo el valor expresado como alcaloides totales en base seca (48). Con el objetivo de reducir la cantidad de estas sustancias de la semilla, se realiza el proceso de desamargado, o también llamado deslupinización; de tal manera que puede ser incorporado en la alimentación humana (55).

Varias investigaciones se han dirigido a encontrar procesos adecuados para la eliminación de los AQ presentes en las especies de lupino con un enfoque industrial y agronómico. En caso de la especie *Lupinus mutabilis*, el mejoramiento agrícola no ha presentado muchos avances. Actualmente el proceso convencional para el desamargado es exponer los granos en agua a una cierta temperatura y por un periodo de tiempo (19). La etapa inicial del desamargado consiste en remojar los granos por un periodo aproximado de 20 h para que esté completamente hidratado y puedan extraerse los alcaloides en etapas posteriores. La segunda etapa implica la cocción de los granos durante un periodo de 5 a 6 h logrando inactivar las enzimas germinativas del grano, solubilizando las proteínas, así como también reduciendo la carga microbiana superficial. Finalmente se realiza la remoción de los alcaloides mediante procesos biológicos o químicos dependiendo de su concentración (34).

Las ventajas de la implementación de nuevos métodos de desamargado, diferente al método convencional podrían mantener el valor nutricional de las semillas y disminuir el tiempo de extracción de los alcaloides, de tal manera de promover el uso moderado de agua (56). Se reportan varios estudios en donde se comparan métodos de extracción de los AQ utilizando fluidos supercríticos como el dióxido de carbono supercrítico (FSC-CO₂), otros estudios donde la extracción es asistida por microondas y ultrasonido (57), así como también el uso de soluciones como cloruro de sodio y ácido cítrico (58).

Los AQ a dosis tóxicas afectan los canales de Na⁺ y K⁺, induciendo síntomas gastrointestinales, problemas nerviosos y respiratorios tanto en humanos como en animales; además de presentar efectos teratogénicos (55). Sin embargo, se ha reportado que los alcaloides totales en la especie *L. angustifolius* no son cancerígenos, ni teratogénicos y sus niveles de dosis letal media (LD50) están por encima de los niveles que se consumirían en una dieta normal (55).

En el estudio de toxicidad aguda llevado a cabo por Petterson et al. (36), se informó que la dosis letal media (LD50) de una mezcla de alcaloides de lupino fue de 2300 mg/kg de peso corporal en ratas alimentadas previamente y de 1700 mg/kg de peso corporal en ratas en ayunas (36). Además, se observó que la LD50 por inyección intraperitoneal en ratas en ayunas fue de 180 mg/kg de peso corporal para la lupanina y 200 mg/kg de peso corporal para la 13-hidroxilupanina. Tanto la administración oral como la intraperitoneal de los alcaloides provocaron signos nerviosos, incluyendo temblores, seguidos de convulsiones, cianosis, colapso y muerte. En algunas ratas post mortem se encontraron problemas hepáticos y pulmonares post mortem (59).

1.3.3. Propiedades farmacológicas de los AQ

Los conocimientos y saberes andinos de los agricultores de la cultura Aymara en Puno, han permitido ampliar el campo de la medicina tradicional reportándose en algunos estudios *in vitro* propiedades inmunosupresoras, antiarrítmicas e hipocolesterolémicas (4,19). La esparteína ha demostrado numerosas propiedades farmacológicas tanto en humanos como en modelos animales, por ejemplo, se ha descubierto que la esparteína exhibe actividad antiarrítmica, actúa como bloqueador de los canales de sodio, clasificándolo dentro de la categoría de agentes antiarrítmicos (52). En el páncreas, induce la secreción de insulina y glucagón y exhibe un efecto hipoglucemiante (14). Además, se ha demostrado que presenta actividades diuréticas, antiinflamatorias (14) y también ha mostrado a través de un estudio *in vitro* actividad bacteriostática y antimicrobiana sobre el crecimiento de 4 cepas de

Mycobacterium tuberculosis (15). Sin embargo, este metabolito no está aprobada por la FDA para uso humano, por lo que son necesarios más estudios para validar sus propiedades (52).

Mientras tanto, la lupanina ha presentado un efecto hipoglicémico in vitro e in vivo mediante la liberación de insulina que se encuentra estimulada por la glucosa afectando directamente los canales KATP (canales de potasio sensibles a ATP) llegando a ser útil para el tratamiento de apoyo de la diabetes mellitus tipo 2 (12).

Aunque los alcaloides pueden resultar tóxicos en concentraciones elevadas, se han descrito varias propiedades biológicas para los extractos de lupino que son ricos en alcaloides. Estas propiedades incluyen efectos antimutagénicos, antibacterianos, antifúngicos y anticancerígenos (59). Estos efectos farmacológicos varían según la especie estudiada, pero es de suma importancia contribuir con el conocimiento científico a través de la investigación del posible uso medicinal de este cultivo, en especial del germoplasma peruano (60).

1.4. Métodos de extracción de alcaloides quinolizidínicos

1.4.1. Métodos de extracción

El proceso de extracción de alcaloides parte, en líneas generales, del principio de que estas sustancias suelen encontrarse en las plantas en forma de sales. Su comportamiento como bases permite aprovechar las diferencias de solubilidad que presentan entre medios acuosos y disolventes orgánicos. Sin embargo, las semillas también contienen lípidos, ceras, terpenos, pigmentos y otras moléculas lipofílicas que pueden entorpecer el procedimiento de extracción, principalmente por inducir la formación de emulsiones. Para minimizar estos inconvenientes, se realiza una etapa previa de eliminación de lípidos sobre el material vegetal triturado, empleando disolventes como éter de petróleo o hexano. Aunque no es lo habitual, en algunas situaciones específicas, estos mismos disolventes pueden usarse directamente para extraer alcaloides si se trabaja en un medio neutro (42).

1.4.1.1. Extracción en medio alcalino

La extracción de alcaloides puede iniciarse humedeciendo el material vegetal previamente pulverizado con soluciones diluidas de bases suaves, como el amoníaco o el carbonato de sodio. Este paso permite la liberación de los alcaloides en su forma básica, facilitando su posterior extracción. A continuación, se emplean disolventes orgánicos como el diclorometano, cloroformo, éter etílico o acetato de etilo, los cuales no solo solubilizan los alcaloides libres, sino también otras sustancias lipofílicas presentes en la muestra. Una vez obtenida esta fracción orgánica, se lleva a cabo una etapa de lavado con agua acidificada, lo que provoca que los alcaloides vuelvan a formar sales solubles en el medio acuoso y, por tanto, migren a esta fase. Las impurezas no polares, como pigmentos y compuestos liposolubles,

permanecen en la fase orgánica debido a su baja afinidad con el agua, lo que permite eliminarlas fácilmente por separación de fases en una ampolla de decantación. Para recuperar los alcaloides en su forma básica, la fase acuosa resultante se alcaliniza nuevamente, ya sea con bicarbonato de sodio o con amoníaco. Este cambio de pH induce la precipitación o extracción de los alcaloides, que luego pueden ser separados mediante técnicas como la filtración o una nueva extracción con disolventes orgánicos, según se requiera (42,44).

1.4.1.2. Extracción en medio ácido

La extracción inicial de alcaloides comienza mediante la maceración del material vegetal previamente pulverizado en un medio polar, compuesto por agua o soluciones alcohólicas ligeramente acidificadas, para este fin, se emplean ácidos diluidos como el ácido clorhídrico (HCl 1N), el ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1N), o ácidos orgánicos como el acético. A través de este proceso, los alcaloides presentes pasan al disolvente en forma de sales solubles, junto con otros compuestos también polares (44).

Una vez obtenido este extracto, se procede a alcalinizar la solución utilizando una base adecuada con el objetivo de romper la unión salina de los alcaloides y liberarlos en su forma básica. Posteriormente, se realiza una extracción con disolventes orgánicos en los que los alcaloides básicos son solubles (42,44).

1.5. Métodos de cuantificación de alcaloides quinolizidínicos

1.5.1. Método volumétrico: Ácido-Base

1.5.1.1. Fundamento

Las titulaciones o valoraciones ácido-base se basan en una reacción de neutralización, en donde un ácido reacciona con una cantidad equivalente de base, llegando al punto de equivalencia de la reacción (61,62).

En este tipo de valoraciones el titulante o valorante se caracteriza por siempre ser un ácido o base fuerte con una concentración conocida, mientras que el analito puede ser una base o ácido fuerte o una base o ácido débil. Cuando se trata de un ácido fuerte contra una base fuerte, ambos se encuentran completamente ionizados. Es a partir de la cantidad del valorante empleado para alcanzar el punto final (momento en el que se observa el viraje de color del indicador) que se puede calcular la cantidad de analito en la muestra (62).

Este método ha sido utilizado en la determinación del contenido de AQ totales, de acuerdo con publicaciones reportadas por Estivi et al. (58) y Mirones (57), e incluso se ha establecido una norma técnica Norma Técnica Ecuatoriana (8). A pesar de los estudios realizados, la investigación sigue siendo escasa; además de presentar algunas desventajas como la baja precisión y reproducibilidad del método.

1.5.2. Método por espectrofotometría UV-visible

Se ha demostrado que el análisis espectrofotométrico de los AQ es más completo que un análisis titulométrico, al dar resultados tanto cualitativos como cuantitativos. Este método se caracteriza por presentar mejor precisión, sensibilidad y aplicabilidad a diferentes tipos de moléculas.

1.5.2.1. Fundamento

El método espectrofotométrico se fundamenta en la capacidad que presentan las moléculas para absorber radiación, ya sea en el espectro UV-visible u otros rangos. Las longitudes de onda que una molécula es capaz de absorber van a depender de la estructura atómica, las condiciones del ambiente como el pH, la temperatura, entre otros (61). Este método de cuantificación se basa en la Ley de Lambert & Beer, la cual establece que la cantidad de luz absorbida (A) por una solución es directamente proporcional a la concentración (c) de la sustancia cromófora presente en ella y a la distancia (b) que recorre la luz en dicho medio. Expresado matemáticamente de la siguiente manera: (61)

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

Ecuación 1. Ley de Lambert & Beer (ecuación lineal)

Donde:

A = Absorbancia

ε = Coeficiente de extinción o absorción molar (característico de una sustancia en condiciones definidas)

b = Longitud de trayectoria

c = Concentración de las moléculas absorbentes

La determinación de alcaloides quinolizidínicos totales (AQT) mediante métodos espectrofotométricos se basa en la formación de complejos coloreados entre estos compuestos e indicadores ácidos. Uno de los métodos más empleados utiliza el púrpura de bromocresol (BKP), un indicador ácido-base que permite la formación de pares iónicos con compuestos de naturaleza básica, como los alcaloides (61,63).

Los alcaloides quinolizidínicos son compuestos orgánicos de carácter básico debido a la presencia de átomos de nitrógeno en su estructura, lo que les confiere la capacidad de protonarse o desprotonarse dependiendo del pH del medio. En condiciones alcalinas, estos compuestos se encuentran en su forma libre (base no protonada), lo que favorece su interacción

con el BKP. Bajo estas condiciones, el indicador, en su forma aniónica, se asocia con los alcaloides formando un complejo iónico de naturaleza hidrofóbica (42)

Este complejo es posteriormente extraído a una fase orgánica, comúnmente cloroformo, permitiendo su separación de la fase acuosa. La intensidad del color desarrollado en la fase orgánica es proporcional a la concentración de alcaloides presentes en la muestra, lo que posibilita su cuantificación mediante medición espectrofotométrica a una longitud de onda determinada (6).

Este método es considerado indirecto, ya que no mide directamente los alcaloides individuales, sino la respuesta del complejo formado entre estos y el colorante. No obstante, ha sido ampliamente utilizado en la determinación de AQT debido a su simplicidad, rapidez y costo relativamente bajo, siendo reportado en diversos estudios, como los de Quispe (6), Quina (57) y el método original descrito por Von Baer (64).

1.5.3. Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos con detección espectral, como LC-DAD (Cromatografía Líquida acoplada a detector de arreglo de diodos), GC-MS (Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas) y LC-MS (Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas) para una identificación cualitativa y cuantitativa de los AQ, permiten mejorar la sensibilidad y selectividad, lograr una buena separación de los picos de diversos analitos presentes en la muestra y mantener periodos rápidos de ejecución en el trabajo experimental. Sin embargo, es importante seleccionar el mejor procesamiento de extracción e identificación para cada compuesto.

1.5.3.1. Fundamento

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica que permite separar compuestos de una mezcla química. Estas separaciones se dan por la afinidad que tienen a la fase móvil y pasan a través de una columna conocida como fase estacionaria. La fase móvil transporta la muestra líquida por la columna hasta llegar al detector, logrando la separación de los analitos por la interacción que existe con la fase estacionaria. Luego el detector mide los analitos que fueron eluidos por la columna, detectando señales que son recogidos en un cromatograma, donde el eje “x” es una medida del tiempo y el eje “y” mide una señal específica generada por el detector (absorbancia) (61).

La identificación y cuantificación sobre el contenido y perfil de AQ por LC-DAD, GC-MS y LC-MS es más amplia en especies de lupino como *L. angustifolius*, *L. albus*, *L. mexicanus*, *L. luteus*, entre otras (64–66). Sin embargo, para el caso de *L. mutabilis* Sweet, los

estudios aún son escasos aplicando estos métodos (55,67,68), obteniéndose resultados más confiables y reproducibles.





2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

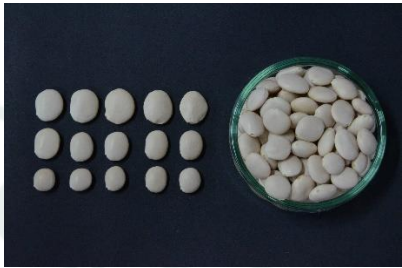
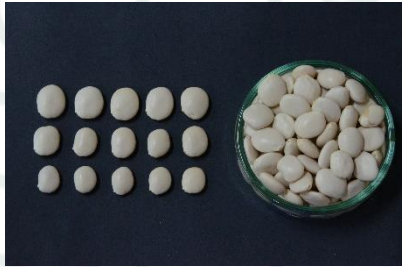
El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Ciencia de los alimentos del Vicerrectorado de Investigación ubicado en el pabellón F (F-404) del campus central de la Universidad Católica de Santa María (UCSM), Arequipa.

2.2. Materiales

2.2.1. Material Biológico

Las semillas de tarwi (semillas secas y maduras) corresponden a 5 variedades comerciales y fueron provistas por el Programa de Investigación y Proyección Social (PIPS) en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), La Molina, Lima, Lima. El recurso evaluado en esta investigación corresponde a granos de *Lupinus mutabilis* (tarwi), el cual ha sido accedido bajo el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 014-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA, con RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 015-2025-INIA-DGIA con fecha del 4 de diciembre del 2025 (Anexo 1). La autorización ha sido otorgada a la Universidad Católica de Santa María para el acceso a los recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi), cuya titularidad y soberanía es ejercida exclusivamente por el Estado Peruano, para su uso exclusivo en la ejecución del proyecto de investigación: “Valorización de los alcaloides del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet): extracción, análisis por métodos espectroscópicos y espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-QTOF-MS) y evaluación *in vitro* de su potencial antihiperglicémico, antioxidante, y antiobesidad en muestras comerciales peruanas”. En la Tabla 2 se detallan las muestras y codificación asignada.

Tabla 2. Variedades de tarwi andino (*Lupinus mutabilis* Sweet)

Variedad de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	Codificación	Imagen
Andenes	TA	
Cholo Fuerte	TCF	
Yunguyo	TY	
Paton Grande	TPG	
Alta Gracia	TAG	

*Elaboración propia

2.2.2. Reactivos químicos

- Acetonitrilo grado HPLC (C_2H_3N) (Supelco)
- Ácido fórmico 89-91% (CH_2O_2) (Merck)
- Ácido sulfúrico (96%) (Sigma-Aldrich)
- Ácido tricloroacético (CCl_3COOH) (Sigma Aldrich)
- Cloroformo ($CHCl_3$) (Merck)
- Diclorometano (CH_2Cl_2) (Merck)
- Hidróxido de potasio (KOH) (Merck)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (Merck)
- Isopropanol / 2- Propanol ($CH_3CHOHCH_3$) (Sigma Aldrich)
- Isopropanol / 2-Propanol grado HPLC ($((CH_3)_2CHOH)$) (Supelco)
- Metanol grado HPLC (CH_3OH) (Supelco)
- Óxido de aluminio (Al_2O_3) (Merck)
- Púrpura de bromocresol ($C_{21}H_{16}Br_2O_5S$) (Merck)
- Reactivo de Dragendorff (Merck)
- Rojo de metilo ($C_{16}H_{14}N_3NaO_2S$) (Sigma-Aldrich)

2.2.3. Estándares

- Estándar de (+)-esparteína (Cayman Chemical)
- Estándar de (+)-lupanina perclorato (Cayman Chemical)

2.2.4. Materiales de laboratorio

- Bagueta
- Balón (250 mL)
- Botellas de vidrio con tapa de rosca (100 mL, 500 mL)
- Bureta (10 mL)
- Columna (Kinetex C18 100 Å; 1.7 μ m; 100 x 2.1 mm, Phenomenex, EE.UU)
- Columna (Kinetex EVO C18 100 Å; 1.7 μ m; 100 x 2.1 mm, Phenomenex, EE.UU.)
- Cubetas de vidrio para espectrofotómetro (4 mL)
- Embudo de vidrio
- Espátulas o cucharillas de pesaje
- Filtros de jeringa de PVDF Millex (Sigma Aldrich)
- Filtros de membrana de Nylon (Phenomenex)
- Fiolas (5 mL, 10 mL, 50 mL)

- Fiolas (1 L)
- Fiolas (500 mL)
- Jeringa (1 mL)
- Micropipetas (2- 20 uL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 0.5-5 mL)
- Papel absorbente
- Papel Aluminio
- Papel filtro Whatman N°1
- Parafilm
- Pastilla magnética
- Pinza para soporte universal
- Pipeta graduada de vidrio (1 mL, 5 mL, 10mL)
- Piseta
- Probeta (10 mL, 50 mL, 100 mL)
- Propipeta
- Puntas desechables para micropipeta (20-200 µL, 100-1000 µL, 0.5-5 mL)
- Soporte universal
- Tubos de centrifuga tipo Falcon (15 mL, 50 mL)
- Tubos eppendorf (2 mL)
- Unidad de filtrado accionada por jeringa 0.22 µm (MILLEX-GV, Merck)
- Vasos de precipitados (50 mL, 250 mL)
- Vernier
- Viales de vidrio con tapa de rosca (2 mL) (Thermofisher)

2.2.5. Equipos

- Agitador orbital (SHKE2000-1CE, Thermo Scientific, EE. UU.)
- Agitador orbital (MaxQ 2000, Thermo Scientific, EE. UU.)
- Agitador vortex (Wizard Advance IR, Velp Scientifica, Italia)
- Balanza analítica (Explorer® Analítica, OHAUS, EE. UU.)
- Balanza de precisión (Pioneer™ PX4201, Ohaus®, EE. UU.)
- Baño ultrasónico (Branson 2800, Fisher Scientific, EE. UU.)
- Bomba de vacío (WOB-L 2534, Welch™; Alemania)
- Bomba cuaternaria (Ultimate 3000 RS, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.)
- Campana extractora (FHI800(P), BIOBASE, EE. UU.)

- Centrífuga (Universal 320 R, Hettich, EE. UU.)
- Estufa de secado (UF55, Memmert, Alemania)
- Espectrofotómetro UV-visible (Genesys 150, Thermo Scientific, EE. UU.)
- Espectrofotómetro de color - Colorímetro (CM5, Konica Minolta, Japón)
- Molino analítico (A11 Basic, IKA, Alemania)
- Sistema de rotaevaporación: Baño calefactor (B-100, BUCHI, Suiza), Bomba de vacío (V-100, BUCHI, Suiza), Enfriador para rotavapor (F-250, JULABO, Alemania), Rotavapor (R-100, BUCHI, Suiza)
- Sistema UHPLC (Ultra High-Performance Liquid Chromatography) con detector de arreglo de diodos (DAD) (Vanquish DAD), autosampler, bomba cuaternaria y horno de columna (Ultimate 3000 RS UHPLC system, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).
- Selladora (PFS-300, Chen-he Machine, China).
- Vernier (Mk-0037, Makawa, China)
- Vórtex (WIZARD IR Infrared Vórtex Mixer, Velp Scientifica, Italia)
- Ultraturrax (T25, IKA)

2.3. Métodos de análisis

2.3.1. Análisis de humedad

Se determinó el contenido de humedad de las semillas de tarwi con el fin de expresar los resultados en base seca (bs). La determinación del contenido de humedad se realizó mediante la Norma Técnica Peruana 205.002:1979 (69) para muestras con un porcentaje de humedad menor a 16%. Los resultados fueron expresados en (%) peso/peso.

2.3.2. Análisis del color de las semillas

Se midió el color de las 5 variedades de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) según la escala CIELab* en el colorímetro con un número estimado de cinco repeticiones para cada variedad de tarwi, con un ángulo de observación a 10° y con Iluminante D65, en condiciones de componente especular excluido (SCE). Luego, se determinaron los parámetros de color: Luminosidad (L), coordenadas rojo/verde (a) y coordenadas amarillo/azul (b) (70,71). Además, se evaluó el índice de color (CI) aplicando la Ecuación 2.

$$CI = \frac{100 * a^*}{L * b^*}$$

Ecuación 2. Determinación del índice de color

Donde:

CI = Índice de color

a* = coordenadas rojo/verde

b* = coordenadas amarillo/azul

L = Luminosidad

2.3.3. Caracterización física de las semillas de tarwi

2.3.3.1. Determinación del peso de 100 semillas

Se seleccionaron 100 semillas aleatoriamente de un peso aproximado de 2 kg y se pesaron en una balanza analítica, separando aquellas que ya fueron consideradas en los pesajes previos, este procedimiento se realizó por triplicado (72,73)

2.3.3.2. Determinación de las dimensiones de las semillas

Se midieron el largo, ancho y espesor con el uso de un vernier, considerando 25 semillas tomadas aleatoriamente y las medidas se expresaron en milímetros (mm). El análisis se realizó por triplicado para la medición de cada variedad (72,74).

2.3.4. Preparación de las muestras de tarwi para el análisis de alcaloides quinolizidínicos (AQ)

Se pesó aproximadamente 60 g de granos de tarwi de cada variedad, los cuales fueron separados y molidos en un molino analítico hasta obtener un polvo fino con un tamaño de partícula de 500 μm , posteriormente se tamizó la harina usando una malla N°35. Este procedimiento se realizó por cuádruplicado para cada variedad, constituyendo cada una de estas fracciones, una réplica analítica. Luego se almacenó en bolsas de polietileno de alta densidad a temperatura de -20°C hasta su posterior análisis.

El ensayo para evaluar el efecto del desgrasado sobre el contenido de AQT del tarwi se realizó en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María (Anexo 2) siguiendo NTP 209.263-2018 (75), utilizando para estos ensayos la harina de la variedad TA. Inicialmente, el procedimiento implica la hidrólisis de 4 a 5 g de muestra empleando 55 mL de ácido clorhídrico 8 M, para luego proceder a la extracción de la fracción lipídica con 120 a 150 mL de éter de petróleo en un sistema Soxhlet, llevándose a cabo el proceso a temperatura de ebullición del solvente (aproximadamente $40\text{--}60^{\circ}\text{C}$). Este método permitió estudiar el efecto del desgrasado en medio neutro, considerando que, tras el secado, parte de los alcaloides puede encontrarse en forma base libre y ser susceptible de extracción parcial hacia el solvente orgánico (42). El solvente orgánico fue evaporado completamente del residuo desgrasado y luego éste fue almacenado en bolsas de polietileno de alta densidad a temperatura de -20°C hasta su posterior análisis.

2.3.5. Extracción y análisis del contenido de alcaloides quinolizidínicos totales (AQT) por métodos convencionales

Se realizó una revisión bibliográfica acerca de las metodologías de extracción y cuantificación de AQT por métodos convencionales de tal manera que puedan ser evaluadas. Se observó que la información es muy escasa y existe variabilidad en la aplicación de diferentes parámetros de extracción, por tal motivo, se implementaron primero los métodos originales volumétrico según Von Baer (1978), y espectrofotométrico según Von Baer (1979) (68,69); esta etapa se realizó con la variedad TA.

2.3.5.1 Extracción y cuantificación de AQT por el método volumétrico

Se aplicó el método según la Norma Técnica Ecuatoriana con algunas modificaciones (8). A continuación, se describe la metodología realizada:

Se pesó 100 mg de la muestra de tarwi (harina), agregando 300 mg de Al_2O_3 y 100 μL de KOH 15%. Luego se agregó 2.5 mL de cloroformo (CHCl_3) y se homogenizó la muestra con vortex por 1 min a 24000 rpm, se centrifugó por un periodo de 5 min a 5°C y 5000 rpm, posteriormente se filtró la fase clorofórmica en balones de 250 mL, lavando 2 veces con CHCl_3 (2 mL en cada lavado). Posteriormente, se realizaron las reextracciones necesarias sobre el residuo de la muestra de tarwi (Anexo 3), luego se juntaron las fracciones filtradas, se evaporó a sequedad en el rotavapor a 30°C y se agregó 5 mL de H_2SO_4 0.01 N, además de 3 gotas de rojo de metilo. Finalmente, se tituló con NaOH 0.01 N (Anexo 4) hasta observar un cambio del color rojo a un amarillo tenue y que este sea persistente (6,8,58). Se determinaron los contenidos de AQT, en las muestras y sus residuos respectivos (AQR). Para los cálculos se aplicó la Ecuación 3 y los resultados fueron expresados en % de alcaloides totales en base seca (bs) (g lupanina/100 g muestra bs) (58,76).

$$\% \text{Alcaloides} = \frac{N(\text{NaOH})(5 - Vg \text{ NaOH})(PE \text{ lupanina})}{Masa \text{ de la muestra} * 1000} * 100$$

Ecuación 3. Fórmula para la determinación del % alcaloides totales (8,58,76)

Donde:

N = Normalidad del NaOH equivalente a 0.01 mEq/mL

5 = cantidad en mL de H_2SO_4 que neutralizan al NaOH

Vg NaOH = Volumen gastado del titulante

PE lupanina = Peso equivalente de la lupanina equivalente a 248 mg/mEq

Masa de la muestra = Muestra pesada en g

1000 = factor de ajuste de unidades de mg a g

2.3.5.2 Extracción y cuantificación de AQT por el método espectrofotométrico

Se aplicó el método original según Von Baer (77). Se pesó 100 mg de la muestra de tarwi (harina), se agregó 300 mg Al_2O_3 y 100 μL de KOH 15%. Luego de adicionar 10 mL de CHCl_3 , se homogenizó la muestra por 30 min en agitador orbital y posteriormente se centrifugó a 5°C a 5000 rpm por 5 min, se filtró la fase clorofórmica lavando con 2 mL de CHCl_3 y se realizaron dos reextracciones sobre el residuo con 5 mL de CHCl_3 , hasta obtener un volumen final de 25 mL.

Para la cuantificación de los AQT, se tomó una alícuota de 500 μL de la muestra y se diluyó hasta un volumen final de 10 mL con CHCl_3 en un tubo de vidrio con tapa. Posteriormente se agregó 100 μL del indicador BKP a una concentración de 4 mg/mL y se dejó en reposo durante 10 minutos para permitir la formación de un complejo coloreado producto de la reacción. Posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 410 nm (6,56,57). Se determinaron los contenidos de AQT, en las muestras y sus residuos respectivos (AQR).

Se realizó un barrido espectral de la muestra después de la reacción con el fin de confirmar la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) del complejo coloreado formado debido a que algunas fuentes señalan una $\lambda_{\text{máx}}$ de 410 nm y otras una $\lambda_{\text{máx}}$ de 450 nm (3,6,77). En el Anexo 5 se observa el espectro de absorción de la muestra analizada, donde la máxima intensidad de absorbancia alcanza un valor de 0.802 a una longitud de onda de 410 nm, mientras que para una longitud de 450 nm la intensidad de absorción es menor (0.395). Después de analizar los resultados obtenidos a partir del barrido, se confirmó que el complejo coloreado de la reacción presentó una intensidad de absorbancia máxima a 410 nm.

Los cálculos se realizaron con la Ecuación 4 y los resultados fueron expresados en % de lupanina (g lupanina/ 100 g muestra bs) (6,77).

$$\% \text{ Alcaloides} = \frac{(DO)(F)(PM \text{ lupanina})(V_t)}{\text{Masa de la muestra} * V_p} * 0.1$$

Ecuación 4. Fórmula para la determinación de alcaloides expresados en % de lupanina según Von Baer (77).

Donde:

DO = Densidad óptica, absorbancia de la muestra

F = Factor de calibración para la lupanina 0.422 que multiplicado con la extinción correspondiente da el μmol alcaloide en la solución de medición de 10 mL.

PM lupanina = Peso molecular de la lupanina equivalente a 248 mg/ μmol

Vt: Volumen total del extracto en mL

Masa de la muestra = Cantidad de muestra pesada en mg

Vp: Volumen de la alícuota del extracto que se utiliza para la reacción con la solución púrpura bromocresol BKP (mL).

0.1 = factor de ajuste de unidades

2.3.5.2 Extracción de AQT por el método de Muzquiz y cuantificación por espectrofotometría (Método de Muzquiz adaptado)

Se aplicó el método según Muzquiz (78), el cual considera 2 etapas de extracción de los AQT; primero con una solución acuosa ácida y luego con un solvente orgánico en condiciones alcalinas. Para la cuantificación de los AQT se procedió luego según el método espectrofotométrico debido a que es una adaptación del método de extracción de Muzquiz (16) con cuantificación por espectrofotometría. de ahora en adelante a este método se le denominará “Método de Muzquiz adaptado”. A continuación, se describe el método de extracción realizado:

Se pesó 500 mg de la muestra de tarwi (harina) y se añadió 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% en un tubo falcon de 50 mL, luego se homogenizó la muestra en un agitador orbital por 30 min, culminado el tiempo se centrifugó por 5 min a 5000 rpm con una temperatura de 5°C, luego se retiró el sobrenadante en un tubo falcon de 50 mL, el proceso de extracción se realizó dos veces más a partir del residuo formado. Los sobrenadantes obtenidos se juntaron y el extracto se neutralizó con 1 mL de NaOH 10 M agitando suavemente, finalmente se añadió 20 mL de diclorometano (DCM) y se homogenizó la muestra durante 1 min con la ayuda de un vortex; con el objetivo de agilizar la separación de la fase orgánica se centrifugó por 5 min a 7500 rpm a 5°C y se trasvasó dicha fase a un balón de 250 mL, este proceso de extracción de alcaloides con DCM se realizó tres veces, posteriormente el solvente fue rotaevaporado a sequedad.

La cuantificación de los AQT se realizó por el método espectrofotométrico para lo cual el extracto se resuspendió en 20 ml de CHCl_3 , luego se tomó una alícuota de 70 μL para la muestra, y se diluyó hasta un volumen final de 10 ml con CHCl_3 en un tubo de vidrio con tapa. Posteriormente se agregó 100 μL del indicador BKP a una concentración de 4 mg/mL y se dejó en reposo durante 10 minutos para permitir la formación de un complejo coloreado producto de la reacción. Posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 410 nm (6,56,57). Se determinaron los contenidos de AQT, en las muestras y sus residuos respectivos (AQR).

Los cálculos para cuantificación de los AQT se realizaron aplicando la Ecuación 7 y los resultados fueron expresados en % de Lupanina en bs.

2.3.6. Análisis del contenido y perfil de los AQ por UHPLC-DAD

Para el análisis de AQ por UHPLC-DAD, se aplicó previamente el método de extracción según Muzquiz (78), pero optimizando diversos parámetros relacionados a este proceso de extracción, según será presentado en el punto 2.4 y la Tabla 6.

2.3.6.1. Determinación de las condiciones de separación cromatográfica por UHPLC-DAD

En el Anexo 6 se describen las pruebas realizadas para determinar las mejores condiciones de separación cromatográfica por UHPLC-DAD con la columna C18, utilizando soluciones de estándares de lupanina y esparteína debido a que son los AQ mayoritarios en el tarwi.

Se probaron parámetros utilizados en estudios previos luego de una revisión de literatura. Se encontraron muy pocos trabajos en tarwi con el uso de HPLC, la mayoría fueron reportes sobre lupino de otras especies (79). Se probaron diversos parámetros de separación: gradientes de elución (de dos y tres fases), composición de las fases móviles y flujos. Para la detección de los compuestos, también se probaron diferentes longitudes de onda, con el fin de confirmar aquella que permita la mejor detección de cada compuesto (Ver Anexo 7 para mayor detalle).

Según los resultados, se observó que no fue posible detectar y cuantificar ambos compuestos (lupanina y esparteína) con un solo método. Así, el método AQ-8 resultó más adecuado para el análisis de lupanina (usando como fases móviles: H₂O 100% y ACN:CH₂O₂ 0.05%), mientras que el método AQ-9 fue más apropiada para esparteína (usando como fases móviles: H₂O:CH₂O₂ 0.05% y ACN:CH₂O₂ 0.05%) este compuesto requirió fases móviles con mayor acidez, indicando que fue necesaria una mayor protonación para una adecuada elución, lo cual se evidenció en la obtención de un pico más definido y simétrico. Los mejores métodos cromatográficos con la columna C18 fueron utilizados para la cuantificación de lupanina y esparteína y sus derivados en la etapa de optimización de las condiciones de extracción según Muzquiz (78).

Para el análisis de las variedades comerciales de tarwi, se utilizaron las mismas condiciones de separación adecuadas según los resultados previamente expuestos. En esta etapa se utilizó una columna EVO C18 (contenido de carbono aproximado de 12%) debido a su mayor estabilidad química (presentando un rango operativo de pH de 1 a 12); de tal manera que se puede implementar condiciones ácidas o básicas sin comprometer la integridad de la fase estacionaria. Además, se consideró la columna EVO C18 por su mejor selectividad cromatográfica, permitiendo una mejor resolución de los AQ (lupanina y esparteína), con picos más simétricos y menor efecto de cola, respecto a lo observado con la columna C18 (80).

En el siguiente punto se describen las condiciones cromatográficas finales para el análisis de AQ por UHPLC-DAD.

2.3.6.2 Método cromatográfico para el análisis de lupanina y esparteína por UHPLC-DAD

Se utilizó una columna C18 o EVO C18 en fase reversa según fue explicado anteriormente. La fase móvil estuvo compuesta por agua (H₂O 100%) (A) y acetonitrilo: ácido fórmico 0.05% (ACN: CH₂O₂ 0.05%) (B) (para el análisis de lupanina y compuestos derivados), o por agua:ácido fórmico 0.05% (H₂O:CH₂O₂ 0.05%) (A) y acetonitrilo:ácido fórmico 0.05% (ACN: CH₂O₂ 0.05%) (B) (para el análisis de esparteína y compuestos derivados). Las fases móviles fueron filtradas y sonicadas por un periodo de 5 min. Se inyectaron 5 µL de la muestra filtrada con filtros PVDF con un diámetro de 13 mm y con un tamaño de poro de 0.45 µm; luego se inyectó al sistema UHPLC-DAD, considerando un flujo de 0.3 mL/min, temperatura de columna de 40°C, temperatura del autosampler a 5°C y con un gradiente de elución indicado en la Tabla 3. La detección de lupanina fue a 205 nm y de esparteína a 305 nm; y la identificación se realizó comparando los tiempos de retención y espectros de absorción de las muestras con aquellos de los estándares de lupanina y esparteína, respectivamente. La cuantificación se realizó construyendo una curva de calibración con estándares de lupanina y esparteína (Anexos 8 y 9) y los resultados fueron expresados en g de lupanina o esparteína/ 100 g en bs.

Tabla 3. Gradiente de elución para el análisis de lupanina, esparteína y compuestos derivados por UHPLC-DAD

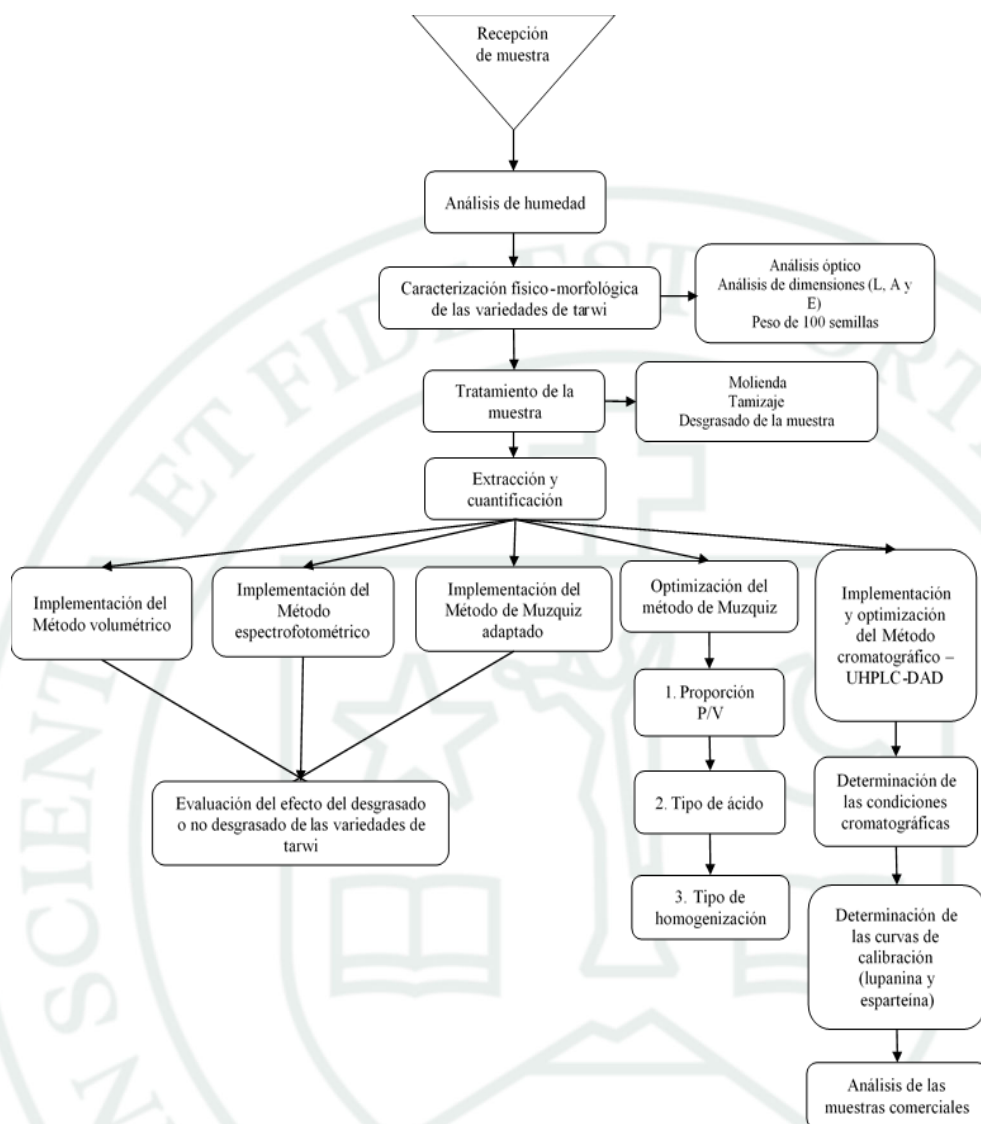
Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
	• H₂O 100% (lupanina y derivados) - o • H₂O:CH₂O₂ 0.05% (esparteína y derivados)	ACN:CH ₂ O ₂ 0.05%
0-1	98	2
3	75	25
5	35	65
8-9	0	100
10-15	98	2

2.4. Metodología experimental

La metodología experimental se desarrolló siguiendo un flujo general de trabajo (Figura 12), el cual comprendió la preparación de las muestras de tarwi, la caracterización físico-morfológica, la implementación de los métodos convencionales de análisis de AQ, la optimización de la extracción de AQ con el método de Muzquiz (78) con detección por UHPLC-DAD y, finalmente, el análisis del contenido de alcaloides en muestras comerciales por UHPLC-DAD.



Figura 12. Diagrama de flujo de procesamiento de la muestra hasta la obtención de AQT



* Elaboración propia.

A) Caracterización físico-morfológica de las semillas de tarwi

En la Tabla 4, se presenta el diseño experimental respectivo:

Tabla 4. Diseño experimental para la caracterización físico-morfológica de las semillas de tarwi.

Variables independientes	Variables Dependientes
Variedades	Parámetros de color (L, a, b y CI)
• Tarwi Andenes (TA)	Largo
• Tarwi Cholo Fuerte	Ancho
• Tarwi Yunguyo	Espesor
• Tarwi Paton Grande	Grosor
• Tarwi Alta Gracia	Peso de 100 granos

*CI (Índice de color)

B) Implementación de los métodos convencionales volumétrico y espectrofotométrico y evaluación del efecto del desgrasado o no desgrasado del tarwi

Una vez implementados los métodos convencionales (volumétrico, espectrofotométrico y método de Muzquiz adaptado), se evaluó el efecto del desgrasado de la muestra de tarwi sobre el proceso de extracción de alcaloides totales, debido a que la presencia de lípidos puede interferir en la eficiencia de la extracción y en el posterior análisis cromatográfico. Sin embargo, el proceso de desgrasado que sufrió la muestra con éter de petróleo a una temperatura aproximada de 40 a 60°C podría indicar una posible pérdida de AQ en la harina de tarwi; para la evaluación de esta etapa se utilizó la variedad de TA en todos los experimentos. El diseño experimental se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental para la evaluación del efecto del desgrasado del tarwi utilizando métodos de análisis para AQT convencionales.

Variables independientes		Variable Dependiente
Tratamiento de la muestra	Tipo de método	Alcaloides quinolizidínicos totales (AQT)
Muestra sin desgrasar	Método volumétrico	
	Método espectrofotométrico	
	Método de Muzquiz adaptado	

C) Optimización de la extracción de AQ con el método de Muzquiz

Se realizó un análisis bibliográfico a partir de publicaciones científicas que han aplicado el método de extracción según Muzquiz (16), encontrándose que existen variaciones respecto a parámetros como la proporción peso/volumen (P/V) (54,55,78,81–83), tipo y la concentración del ácido (55,67,68,78) y tipo de homogenización (78,84–86).

Se consideró el diseño experimental presentado en la Tabla 6. En la primera etapa, se utilizó el método de extracción según Muzquiz (78) explicado en el punto 2.3.5.2, únicamente evaluando la variable independiente peso/volumen (P/V). Una vez determinado el mejor P/V en función a la concentración de AQ, se procedió a evaluar el efecto del tipo de ácido (utilizando el P/V seleccionado). Finalmente, se evaluó el efecto del tipo de homogenización (con agitación orbital, con ultraturrax y con baño de ultrasonido), aplicando las variables P/V y tipo de ácido que dieron los mejores resultados en AQT. El análisis de AQ se realizó con el método por UHPLC-DAD.

Tabla 6. Diseño experimental para optimizar los parámetros del proceso de extracción según la metodología de Muzquiz.

Secuencia de etapas	Variables independientes	Tratamientos	Variable dependiente
Etap 1	Proporción peso/volumen (P/V) (1/5 y 1/10)	T1:1/5 T2:1/10	Concentración de alcaloides quinolizidínicos totales (g/100g bs) por UHPLC-DAD
Etap 2	Tipo de Ácido HCl (0.1 N, 0.5 N y 1 N) Ácido Tricloroacético (TCA) (5%)	T1: HCl 0.1 N T2: HCl 0.5 N T3: HCl 1 N T4: TCA 5%	
Etap 3	Agitador orbital Tiempo (15, 30 y 60 min) Velocidades (100 y 200 rpm)	T1: 100 rpm a 15 min T2: 100 rpm a 30 min T3: 100 rpm a 60 min T4: 200 rpm a 15 min T5: 200 rpm a 30 min T6: 200 rpm a 60 min	
	Ultraturrax Tiempo (30 y 60 s) Velocidades (5000, 10000, 15000 y 20000 rpm)	T1: 5000 rpm a 30 seg T2: 5000 rpm a 60 seg T3: 10000 rpm a 30 seg T4: 10000 rpm a 60 seg T5: 15000 rpm a 30 seg T6: 15000 rpm a 60 seg T7: 20000 rpm a 30 seg T8: 20000 rpm a 60 seg	
	Baño de ultrasonido^a Tiempo (15, 30 y 60 min)	T1: 15 min T2: 30 min T3: 60 min	

*Elaboración propia. ^aOperado a 40 kHz con una potencia ultrasónica aproximada de 100-120 W

D) Análisis del contenido de alcaloides en muestras comerciales de tarwi

En la etapa final se realizó el análisis del contenido de AQ en cinco muestras comerciales de tarwi, utilizando el método de Muzquiz adaptado y el método de extracción de Muzquiz (78) optimizado según el punto C (Tabla 7).

El análisis por UHPLC-DAD también permitió identificar exactamente los contenidos de lupanina y esparteína, así como compuestos derivados (con similar espectro de absorción, pero detectado a diferente tiempo de retención respecto al estándar).

Tabla 7. Diseño experimental para el análisis del contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ) para cada variedad de tarwi implementando varios métodos.

Variables independientes		Variable dependiente
Variedades	Tipo de Método	
TY	1. Muzquiz adaptado 2. Muzquiz optimizado por UHPLC-DAD	Concentración de alcaloides quinolizidínicos totales (g/100 g bs)
TAG	1. Muzquiz adaptado 2. Muzquiz optimizado por UHPLC-DAD	
TA	1. Muzquiz adaptado 2. Muzquiz optimizado por UHPLC-DAD	
TPG	1. Muzquiz adaptado 2. Muzquiz optimizado por UHPLC-DAD	
TCF	1. Muzquiz adaptado 2. Muzquiz optimizado por UHPLC-DAD	

*Elaboración propia.

2.5. Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados por triplicado, mientras que los análisis de AQ en las variedades de tarwi fueron realizados por cuádruplicado. Los análisis estadísticos se realizaron con el software R (versión 4.4.2) y los resultados fueron expresados como promedio $\pm$ desviación estándar. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía o dos (según corresponda) para aquellos datos que cumplieron con los supuestos de normalidad realizados mediante la prueba de Shapiro Wilk y de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. En el caso de los datos que no cumplieron los supuestos se usaron análisis no paramétricos como Kruskal-Wallis o Scheirer-Ray-Hare (versión bifactorial de la prueba de Kruskal-Wallis). Finalmente, se realizaron pruebas de comparación múltiple paramétrico por test HSD de Tukey para ANOVA de una vía o dos vías y no paramétrico de Dunn con arreglo de Bonferroni, incluyendo un nivel de significancia fue $p > 0.05$.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización física de las variedades comerciales de tarwi

3.1.1. Análisis del color

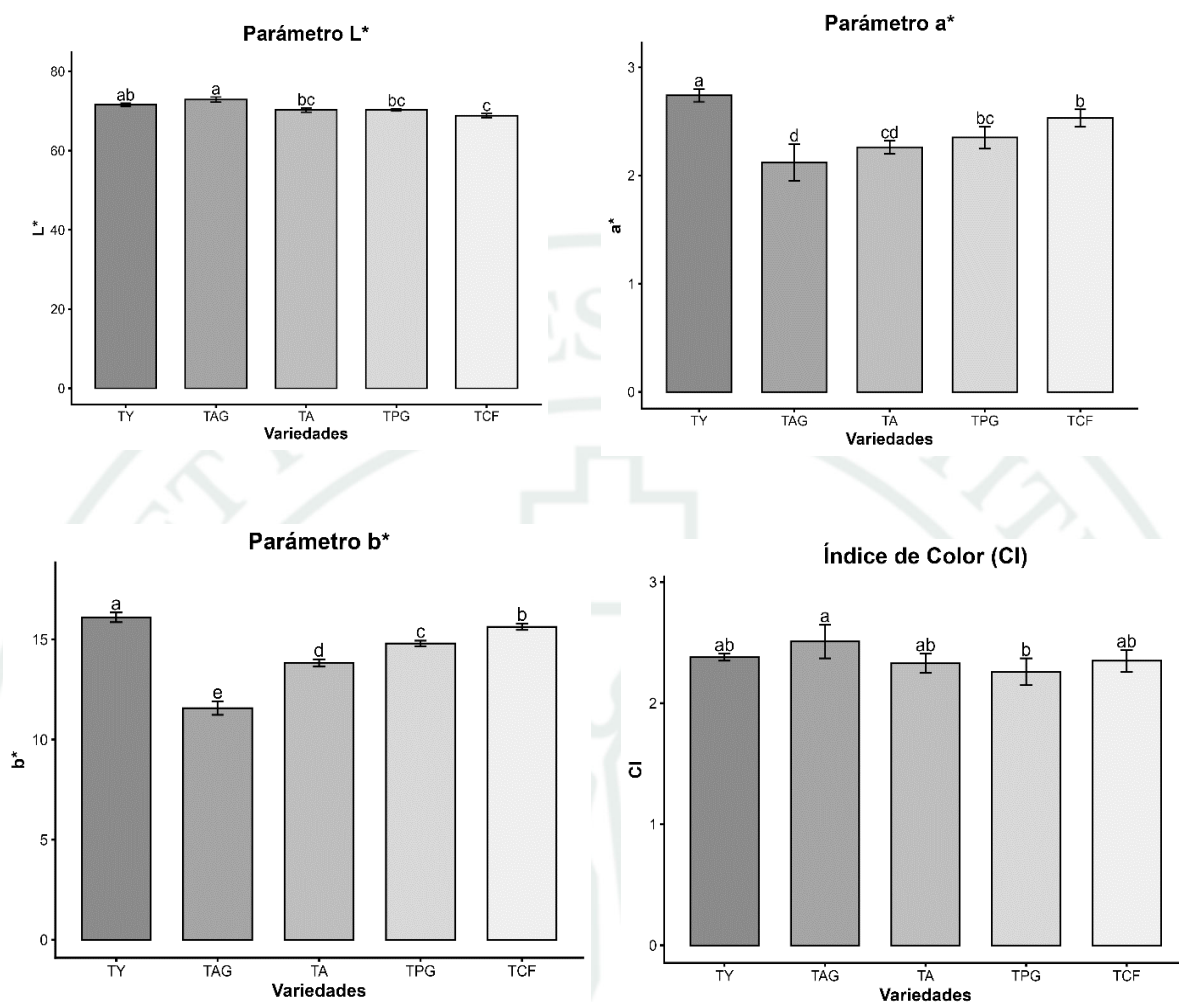
La evaluación del color para las 5 variedades de tarwi se llevó a cabo utilizando la escala CIELab, la cual mide los parámetros de luminosidad (L^*), tonalidad rojo/verde (a^*), y tonalidad amarillo/azul (b^*). Los resultados obtenidos se presentan en el Figura 13 (Anexo 10 – Tabla A10-1)

Todas las variedades mostraron una luminosidad clara para todas las variedades; sin embargo, existieron diferencias significativas entre ellas; la variedad TAG presentó una mayor luminosidad (72.85 ± 0.65), seguida de la variedad TY (71.55 ± 0.41), mientras que la variedad TCF presentó menor luminosidad (68.82 ± 0.51) frente a las otras variedades.

Las cinco variedades de tarwi presentaron diferencias significativas tanto en el parámetro a^* como en el parámetro b^* ; sin embargo, todas las variedades se encontraron dentro de las tonalidades amarillas. El valor más alto registrado para el parámetro a^* fue para la variedad TY (2.74 ± 0.06) mientras que el menor valor (2.12 ± 0.17) fue para la variedad TAG; por otro lado, al evaluar el parámetro b^* , se observó de igual manera que la variedad TY presentó el mayor valor en comparación con la variedad TAG (16.10 ± 0.24 y 11.57 ± 0.34 , respectivamente) (Figura 13).

La información acerca de la medición del color en semillas de tarwi por la escala CIELab* es muy limitada, por tal motivo se dificulta la comparación de resultados en las mismas condiciones trabajadas. Uno de los pocos estudios realizados en variedades de tarwi peruano es el de Briceño Berrú (71), quienes también evaluaron el color en variedades como Andenes, Cholo fuerte, Altagracia, Paton grande y Yunguyo, reportando valores en promedio de $L = 82.96 \pm 0.76$, $a^* = -2.44 \pm 0.35$ y $b^* = 27.52 \pm 0.67$, equivalentes a tonalidades claras con ligeras variaciones entre blanco y crema.

Figura 13: Análisis del color en la escala CIELab* de 5 variedades comerciales de tarwi



*N=5. Los valores que presentan la misma letra sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Asimismo, Córdova-Ramos *et al.* (70) reportaron valores de $L = 84.59 \pm 0.90$, $a^* = -2.10 \pm 0.44$ y $b^* = 20.32 \pm 1.55$ en la especie *L. mutabilis* Sweet en las variedades como Andenes, Yunguyo y Altagracia. Ambos autores difieren con los obtenidos en el estudio actual con un promedio de $L = 70.75$, $a^* = 2.4$ y $b^* = 14.38$, lo cual puede atribuirse a que los resultados de Briceño y Córdova *et al.* (70,71) fueron evaluados en la harina de las semillas, mientras que los obtenidos en este estudio corresponden al color de semillas enteras. La caracterización del color de las semillas resulta relevante debido a que este atributo puede estar relacionado con la presencia y concentración de alcaloides y otros metabolitos secundarios, permitiendo evaluar posibles correlaciones con sus propiedades químicas. Asimismo, el análisis del color constituye un criterio objetivo para la diferenciación entre variedades, contribuyendo a una mejor clasificación y caracterización del material vegetal estudiado.

Por otro lado, Parra-Gallardo et al. (87) realizaron un análisis colorimétrico a partir de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet en 5 etapas de maduración calculando el índice de color (CI) según los parámetros en la escala Cielab*, en esta investigación se obtuvo un CI igual a 0.56 luego de 204 días de siembra, mientras que a los 212 días, el valor ascendió a 1.14, observándose un ligero incremento conforme se prolonga el tiempo de maduración. Estos valores difieren con los obtenidos en el estudio presentando un rango de CI entre 2.26 a 2.51; lo que podría indicar que los granos analizados en el presente trabajo tuvieron un mayor tiempo de maduración, lo que habría influido en el aumento del índice registrado.

La coloración de la cubierta de las semillas de tarwi está influenciada por varios factores, entre los más representativos son la etapa de madurez, factores genéticos y la variedad de las semillas, durante las primeras fases del desarrollo los granos presentan tonos verdosos y van cambiando progresivamente en cada etapa de maduración pasando de tonalidades más claras a colores más oscuros (87). Estos cambios de coloración se encuentran asociados principalmente a la acumulación de compuestos fenólicos, tales como flavonoides, taninos condensados (proantocianidinas) y ácidos fenólicos, los cuales se localizan predominantemente en la testa o pericarpio de la semilla (88).

3.1.2. Análisis de las características morfológicas y peso de 100 granos

En la Figura 14 se presentan los resultados de las características morfológicas y el peso de 100 granos de las 5 variedades de las semillas de tarwi evaluadas. El peso de 100 granos de las variedades estudiadas osciló entre un rango de 26.04 g a 28.60 g y con un promedio general de 28.21 ± 1.58 g. Estos valores son comparables a los obtenidos por Vera Vega (72), quienes reportaron un rango entre 20.80 a 30.64 g (Anexo 10 – Tabla A10-2).

Asimismo, Chalampunte (89) reportó valores similares a los del trabajo actual (promedio 26.03 ± 3.43 g) para variedades *Lupinus mutabilis* Sweet cultivados en Ecuador. Sin embargo, Villanueva (25) reportó valores por debajo a los obtenidos en este estudio (21.72 g).

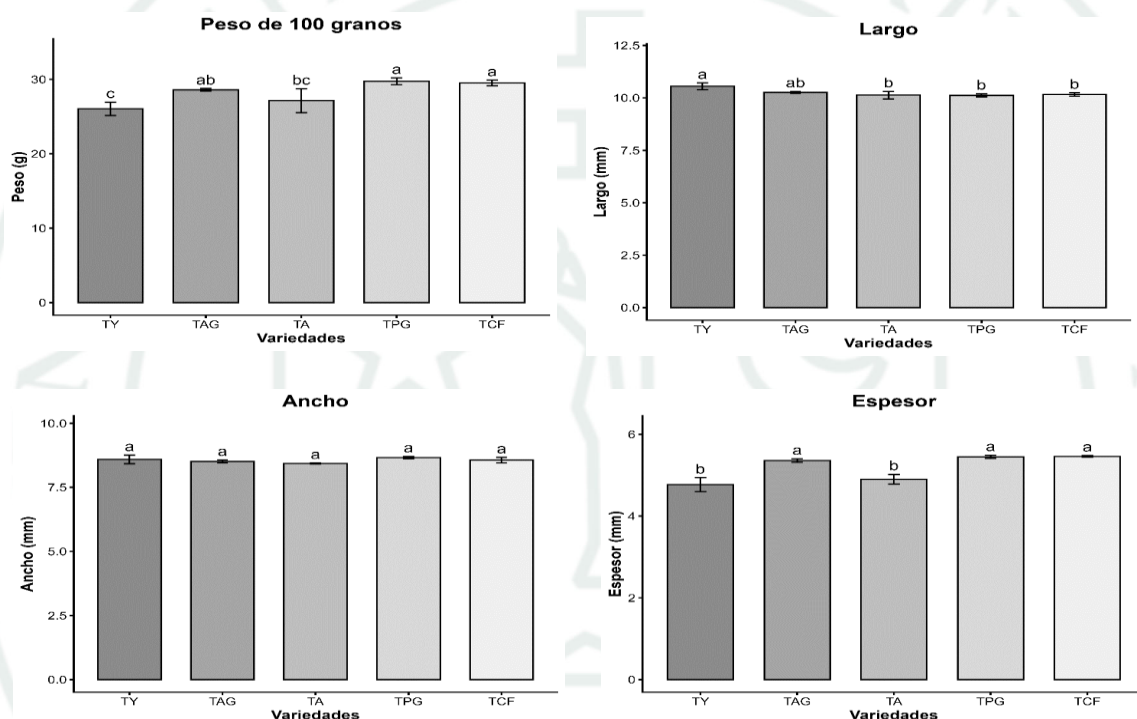
En relación con el efecto de la variedad de tarwi se observó que las variedades con mayor peso de 100 granos fueron las variedades de TCF y TPG mientras que la de menor valor fue la variedad Yunguyo.

La determinación del peso de 100 granos evidenció diferencias entre las variedades evaluadas, lo cual se asocia al tamaño y grado de desarrollo de la semilla, factores que pueden influir en la distribución y concentración de compuestos químicos, incluidos los alcaloides quinolizidínicos y otros metabolitos secundarios. Estudios en especies de lupino han mostrado que el peso de la semilla está correlacionado con variaciones en el perfil de alcaloides y otros

compuestos bioactivos, lo que permite una mejor interpretación de los resultados obtenidos para el contenido de alcaloides entre las variedades estudiadas (90).

En la Figura 14 también se muestran los caracteres morfológicos de las semillas incluyendo el largo, ancho y espesor (Anexo 10 – Tabla 10-2) obteniéndose rangos, de 10.12-10.55 mm, 8.43-8.51 mm y 4.77-5.46 mm, respectivamente; en general, las variedades presentaron valores similares entre sí, en especial para los caracteres de largo y ancho, mientras que para el espesor del grano se observó una mayor variabilidad.

Figura 14. Características morfológicas y peso de 100 granos de semillas de 5 variedades de tarwi



*N=25 semillas. Los valores que presentan la misma letra sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Una mayor variabilidad fue observada en el análisis dimensional realizado por Vera Vega et al. (72) quienes reportaron valores entre 8.32 a 11.62 mm de largo y de 6.97 a 9.34 mm de ancho, evaluando 45 genotipos del *Lupinus mutabilis* Sweet; mientras que Briceño Berrú (71) evaluó 20 ecotipos registrando rangos de 8.90 a 10.99 mm de largo, 6.76 a 9.39 mm de ancho y 3.26 a 5.87 mm de espesor, en su estudio incluyeron también a la variedad TY obteniendo un promedio de 9.14 ± 0.86 mm. estos resultados son comparables a los obtenidos en el presente estudio, sin embargo, en ambos estudios se observa una mayor variabilidad en las dimensiones del grano, lo que podría deberse a que los autores evaluaron un mayor número

de muestras de tarwi, revelando la diversidad fenotípica existente entre las semillas de la especie *Lupinus mutabilis* Sweet, que van desde formas lenticulares, esféricas, ovoidales y oblongas (72).

3.2. Implementación de los métodos convencionales volumétrico y espectrofotométrico para el análisis del contenido de AQ

En los Anexos 03, 04 y 05 se presentan los ensayos preliminares realizados para la implementación y optimización de los métodos de cuantificación de AQT por el método volumétrico y espectrofotométrico. Adicionalmente, se incorporó el análisis del tipo de muestra evaluado: muestra desgrasada (MD) y muestra sin desengrasar (MSD) (Anexo 10 – Tabla A10-3). La mayoría de los estudios realizados con las semillas de *Lupinus mutabilis* evalúan los AQ a partir de muestras de tarwi desgrasadas, realizando un previo tratamiento de desengrasado con n-hexano o con éter de petróleo (3), por tal motivo, en esta investigación también se evaluó el impacto que presenta realizar un tratamiento previo de desengrasado a la muestra de tarwi. Además, se cuantificó el contenido de alcaloides residuales (en el pellet residual) para verificar si la extracción de estos metabolitos fue adecuada.

En el método volumétrico, la evaluación del número de reextracciones mostró que la recuperación de los alcaloides debe ser analizada por cada muestra diferente, así como también se debe realizar una estandarización previa de las soluciones que intervienen en la reacción (NaOH y H_2SO_4) con el fin de asegurar la confiabilidad de los valores obtenidos.

En el caso del método espectrofotométrico, los resultados evidenciaron que la correcta determinación de la longitud de onda de medición fue un factor crítico para garantizar la sensibilidad y reproducibilidad del método. Asimismo, se observó que este procedimiento no permite escalar directamente, ya que los factores empleados en la ecuación de cálculo (77) dependen de volúmenes de reacción definidos. Por ello, la cuantificación se realizó manteniendo constantes dichos volúmenes de acuerdo al método original (77) y variando únicamente la dilución final de las muestras, lo que permitió obtener resultados comparables entre los ensayos.

Adicionalmente, se implementó el método de extracción descrito por Muzquiz (78), adaptado para su determinación por espectrofotometría, permitiendo un mayor rendimiento de extracción de AQT a diferencia del método volumétrico y espectrofotométrico, debido a que la extracción se presenta en dos etapas (en medio ácido y medio alcalino) frente a los métodos convencionales previos donde sólo se utiliza una extracción con cloroformo en condiciones alcalinas.

Los resultados obtenidos bajo este método permitieron evidenciar que la extracción empleada constituye un factor determinante en la cuantificación de los AQT, especialmente cuando se trabaja con matrices complejas como las semillas de tarwi (Figura 15).

Los resultados fueron expresados en porcentaje (%) de lupanina por ser el alcaloide en mayor concentración y se implementó cada uno de los métodos analizando la variedad Tarwi Andenes debido a que esta variedad es más estudiada en comparación con otras. El análisis estadístico evidenció un efecto significativo tanto del tratamiento previo de la muestra (MD y MSD) (Anexo 10 - Tabla A10-3) como del tipo de método de extracción sobre la concentración de AQT (Figura 15)

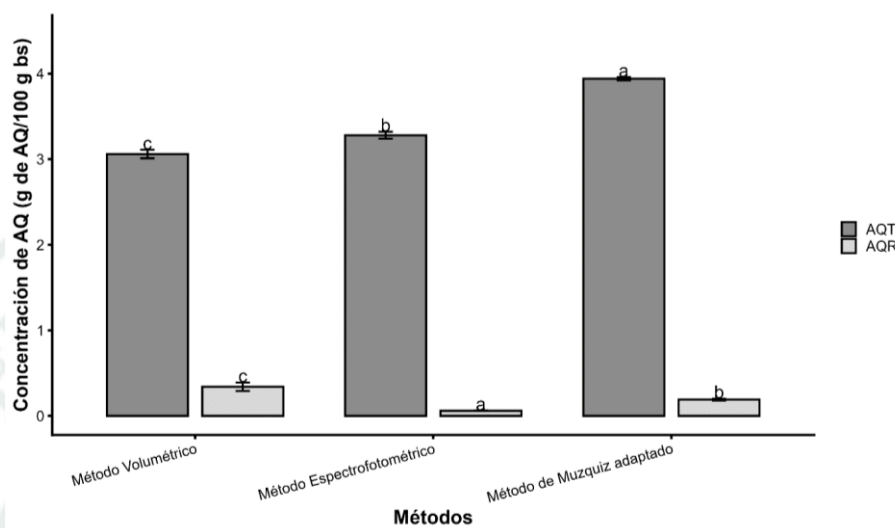
Como análisis preliminar, se observó que el tratamiento previo de la muestra influyó de manera significativa en los resultados obtenidos, registrándose concentraciones mayores de AQT en la muestra sin desgrasar (MSD) en comparación con la muestra desgrasada (MD), independientemente del método analítico aplicado (Anexo 10 - Tabla A10-3).

La MD presentó promedios de $2.49 \pm 0.02\%$ para el método volumétrico, $2.68 \pm 0.07\%$ para el método espectrofotométrico y $3.72 \pm 0.05\%$ con el método de Muzquiz adaptado; este comportamiento fue consistente en los tres métodos evaluados, lo que sugiere que el proceso de desgrasado podría afectar parcialmente la recuperación de los alcaloides, ya sea por pérdidas durante el tratamiento previo o por interacciones con la matriz lipídica. La mayoría de los estudios realizan un desgrasado previo a la muestra para evitar la formación de emulsiones por la presencia de sustancias lipofílicas que pueden interferir en el proceso de extracción (42). Sin embargo, al realizar este tratamiento los AQT disminuyeron en la presente investigación; por tal motivo, en este estudio se optó por analizar la muestra sin desgrasar (MSD) en las etapas siguientes.

En relación al método de extracción (Figura 15); la MSD presentó un promedio de AQT de $3.06 \pm 0.05\%$ y un promedio de AQR de $0.34 \pm 0.05\%$ para el método volumétrico, mientras que con el método espectrofotométrico se obtuvo un promedio de 3.28 ± 0.04 para AQT y de $0.06 \pm 0.002\%$ para AQR. Asimismo, el método de extracción según el método de Muzquiz adaptado presentó valores de AQT y AQR de $3.94 \pm 0.02\%$ y $0.19 \pm 0.01\%$, respectivamente; en este último método de extracción se obtuvieron mayores concentraciones de AQT mostrando diferencias significativas en comparación con los otros métodos de extracción (Anexo 10 – Tabla A10-4). Esta mayor recuperación observada mediante el método de Muzquiz adaptado puede atribuirse a su extracción en dos etapas; que incluye una fase ácida seguida de una fase alcalina, lo cual favorece tanto la solubilización inicial de los compuestos polares como la

posterior liberación de los alcaloides a partir de sus formas salinas para finalmente ser extraídos con el solvente orgánico (42).

Figura 15. Concentración (g lupanina/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales y residuales comparando tres métodos de extracción.



*N=3. AQT (Alcaloides quinolizidínicos totales) AQR (Alcaloides quinolizidínicos residuales) AQ (Alcaloides quinolizidínicos). Los valores que presentan la misma letra en una fila no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

De acuerdo con algunas investigaciones realizadas para la especie *Lupinus mutabilis* Sweet en la variedad Andenes, la MSD presenta concentraciones de alcaloides totales entre 2.39% (6) a 5.74% en bs (85).

La información acerca de la cuantificación de alcaloides quinolizidínicos totales de la especie *Lupinus mutabilis* por el método volumétrico es muy escasa. Sin embargo, Villacrés et al. (3) reportó un rango de alcaloides quinolizidínicos totales de 3.76 a 4.47% en las semillas de tres variedades de *Lupinus mutabilis* Sweet (INIAP-450, INIAP-451 y Criollo). Por otro lado, Von Baer en 1979 (91) aplicando como titulante ácido p-toluensulfónico en cloroformo reportó valores de $3.02 \pm 0.05\%$ obteniendo este valor a partir de una doble extracción de los granos amargos desgrasados de la especie *Lupinus mutabilis* Sweet (variedad no especificada).

Los resultados del presente estudio fueron menores en comparación con los obtenidos por Villacrés (3) y comparables a lo reportado por Von Baer (91). Estas diferencias pueden deberse a factores genéticos, a diferencias en la procedencia del tarwi y el tipo de variedad analizada.

Se ha observado una baja precisión y reproducibilidad de este método al realizar una titulación manual, se evidenciaron algunos factores que podrían afectar los resultados. Entre ellos se destaca la percepción subjetiva del analista para la apreciación del viraje del color lo

cual podría conllevar a la adición excesiva del valorante, subestimando la concentración de alcaloides en la muestra.

Con lo que respecta al método espectrofotométrico, la MSD de *L. mutabilis* Sweet (variedad no especificada) analizada por Rosas Quina (56) reportó un valor de 3.94% bs para los alcaloides totales mientras que para los alcaloides residuales fue de 0.08% bs. Además, Quispe (6) reportó un promedio de AQT de $2.39 \pm 0.16\%$ para la variedad Tarwi Andenes con el mismo método.

Los valores obtenidos en este estudio para la MSD (3.28% para AQT y 0.06% para AQR) se encuentra próximo con el reportado por Quina (56), y es superior al reportado por Quispe (6), a pesar de que este autor evaluó la misma variedad de tarwi. esto sugiere que existirían diferencias aún dentro de la misma variedad de tarwi debido a otros factores que deberían ser evaluados en estudios posteriores.

El método según Muzquiz (78) es específico para AQ y se basa en la extracción de estos metabolitos utilizando soluciones ácidas diluidas permitiendo que los alcaloides se encuentren en forma de sales para posteriormente ser alcalinizados y finalmente ser extraídos con un solvente orgánico no miscible (42). El contenido de AQT para la variedad Andenes fue mayor con el método de Muzquiz adaptado, en comparación con el método volumétrico y espectrofotométrico, reportándose valores de $3.94 \pm 0.02\%$ para la MSD.

A pesar de que el método volumétrico es usado por su simplicidad y bajo costo, suele ser menos preciso y sensible por presentar errores en la determinación final; mientras que el método espectrofotométrico presenta menor margen de error ya que las lecturas no dependen específicamente del analista; sin embargo, los resultados cuantitativos dependen también del método de extracción, el cual fue más eficiente cuando se aplicó el método de Muzquiz (92).

Además de los métodos convencionales, recientemente algunos estudios que cuantifican los AQ en las semillas del tarwi aplican la extracción según Muzquiz (92), pero la detección es realizada con sistemas como HPLC-DAD, LC-MS, GC-MS y GC-FID (68,85,86). Por lo anterior, en la siguiente etapa del trabajo de investigación, se procedió a mejorar los parámetros de extracción aplicando la metodología de extracción de Muzquiz (78) utilizando un sistema UHPLC-DAD para la cuantificación de AQT, ya que permitiría también determinar el perfil o tipo de AQ, a diferencia de los métodos volumétrico y espectrofotométrico que sólo permiten estimar el contenido total de AQ.

3.3. Determinación de los mejores parámetros de extracción según el Método de Muzquiz

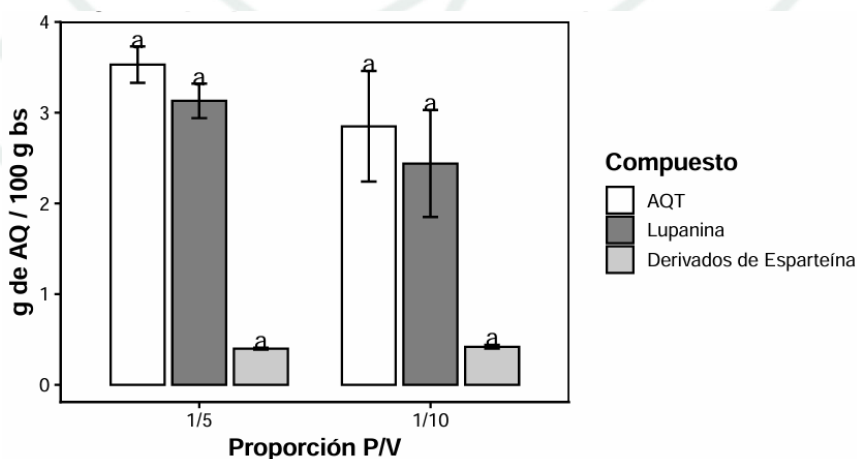
3.3.1. Influencia de la proporción P/V en la eficiencia de extracción

Según varias investigaciones, se han aplicado diferentes proporciones P/V entre un rango de 1/4 a 1/15, aplicando el mismo fundamento de extracción establecido por Muzquiz (54,60,78,81–83,85,86). Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han enfocado en otras especies de Lupino, como *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*; mientras que los estudios para la especie *L. mutabilis* son aún muy limitados.

Como resultado del análisis realizado, se definieron las proporciones P/V de 1/5 y 1/10 por ser las más representativas y comúnmente aplicadas en otros estudios. En esta parte de la investigación, se aplicaron las condiciones de extracción de AQ según Muzquiz (78) y la detección se realizó por UHPLC-DAD (luego de la obtención de las condiciones cromatográficas óptimas, según fue descrito en la metodología) debido a que este método permitió diferenciar entre los alcaloides principales del tarwi, y cuantificarlos utilizando curvas de calibración con estándares correspondientes a los AQ lupanina y esparteína.

Los resultados obtenidos a partir de esta metodología se reportan en el Figura 16, donde el tratamiento con la proporción 1/5 presentó el mayor contenido de AQT con un promedio de 3.53 g de AQ/ 100 g en comparación con la proporción 1/10, con el cual se obtuvo un promedio igual a 2.85 g de AQ/ 100 g. Asimismo, el contenido de lupanina fue mayor cuando se utilizó un P/V de 1/5 con respecto al de 1/10, sin embargo, los compuestos derivados de esparteína presentaron contenidos similares (Anexo 10 – Tabla A10-5).

Figura 16 . Concentración de alcaloides quinolizidínicos (g de AQ/ 100 g bs según la proporción el P/V cuantificado UHPLC-DAD.



*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales). Los valores que presentan la misma letra sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey.

Yucra (67), usando una proporción P/V 1/10, reportó un contenido de lupanina de 4.98 g/100 g cuantificado por HPLC aunque en una variedad diferente de tarwi, mientras que Cortés-Avendaño et al. (85) y Bryson (68) aplicando un P/V mayor (1/50) y usando GC-FID reportaron valores de AQT de 5.74% y 2.38%, respectivamente en la variedad andenes INIA (Cusco) en ambos casos. Independiente de las diferencias a nivel del método analítico utilizado en estos trabajos respecto al del presente estudio, se evidencia que aún en la misma variedad de tarwi, pueden existir diferencias en el contenido de AQT.

Se ha reportado que la eficiencia en la extracción aumenta conforme se incrementa el volumen de solvente hasta alcanzar un punto óptimo, por otro lado, cuando el solvente es excesivo con relación a la muestra, disminuye la eficiencia (93). Además, también es indispensable evaluar el tamaño de partícula dado que la difusividad de los compuestos bioactivos incrementa al disminuir el tamaño; es por ello que la concentración reportada por Cortés-Avendaño et al. (85) a una proporción de 1/50, es mayor a las obtenidas en este estudio, esto podría deberse al uso de un homogenizador mecánico de alta cizalladura (Ultraturrax), condiciones que permitirían una mayor disminución del tamaño de partícula. Sin embargo, la comparación de resultados debería realizarse en las mismas condiciones de extracción, cuantificación y en la misma muestra para un mejor análisis.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la proporción 1/5 para las siguientes etapas del estudio.

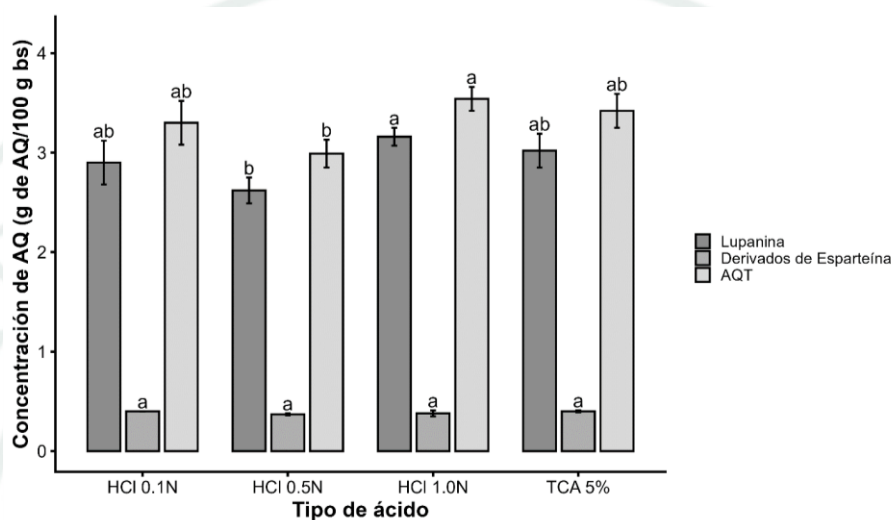
3.3.2. Influencia del tipo de ácido en la eficiencia de extracción

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (HCl 0.1 N, 0.5 N y 1 N) y ácido tricloroacético (TCA 5%) sobre la extracción de AQ en la especie *L. mutabilis* variedad Andenes, siguiendo el fundamento propuesto por Muzquiz. Sin embargo, como ya fue mencionado previamente, la mayoría de los estudios se han centrado en especies como *L. albus*, *L. angustifolius* o *L. luteus*, cuya composición y perfil de alcaloides difiere significativamente respecto al *L. mutabilis*.

En el Figura 17 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de lupanina, derivados de esparteína y alcaloides quinolizidínicos totales (AQT), extraídos utilizando diferentes tipos de ácido y analizados por UHPLC-DAD, donde el tratamiento con HCl 1N presentó la mayor concentración de lupanina (3.16 %) y de AQT (3.54 %). Los tratamientos con HCl 0.1N y HCL 0.5N permitieron obtener cantidades comparables de lupanina y AQT. En cuanto a los derivados de esparteína, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, presentando valores que oscilaron entre 0.37 y 0.40 %.

Las concentraciones de lupanina y AQT con el tratamiento con TCA al 5% fueron similares a los obtenidos con HCl 1 N. Estos resultados reflejan una mejor eficiencia en la extracción de los AQ en medio ácido al inducir la protonación de los grupos nitrogenados presentes en los alcaloides, aumentando así su solubilidad (42).

Figura 17. Concentración (g de AQ/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales según el tipo de ácido cuantificado por UHPLC-DAD



*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales) Los valores que presentan la misma letra sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey o Dunn según corresponda.

Asimismo, estos resultados evidencian que el tipo y la concentración del ácido empleado influyen principalmente en la extracción de lupanina, al ser el principal alcaloide presente en las semillas de tarwi, lo cual incide directamente en el valor de alcaloides totales.

Los resultados obtenidos con TCA al 5 % son comparables a los del tratamiento con HCl 1 N evidenciando que los ácidos orgánicos fuertes constituyen una alternativa viable frente al uso de los ácidos minerales, reduciendo el riesgo químico por el uso de compuestos corrosivos; es por ello, que se optó por emplear TCA 5% para las siguientes etapas de la investigación (Anexo 10 – Tabla A10-6).

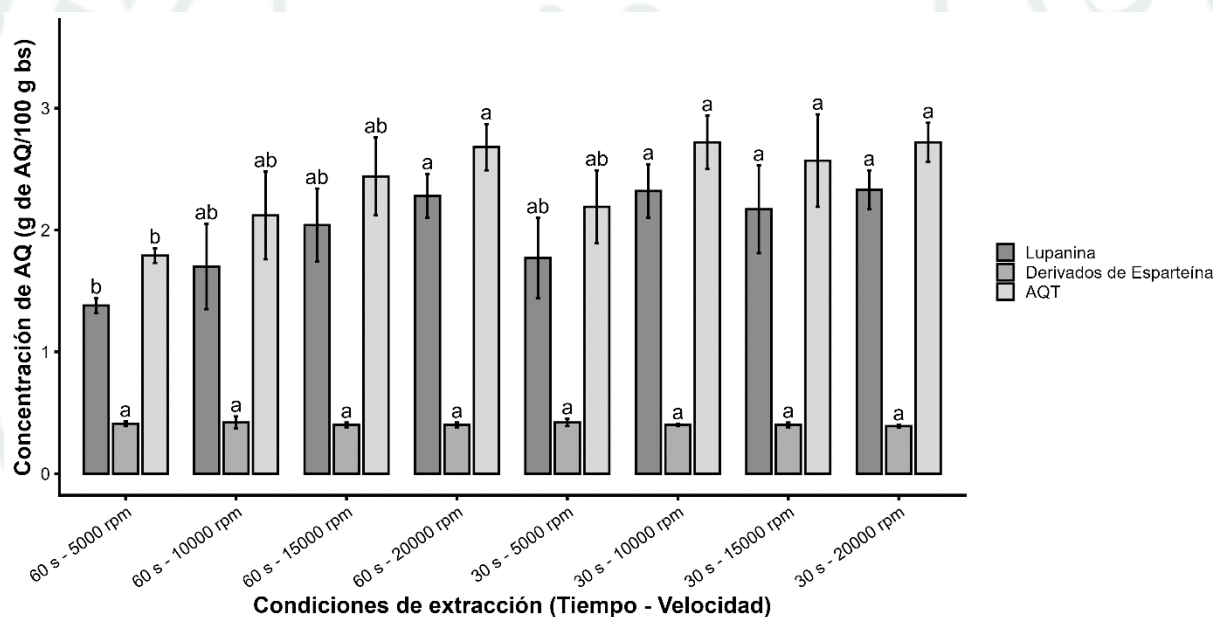
3.3.3. Influencia del tipo de homogenización

Luego de establecer el P/V y el tipo de ácido que permitieron maximizar la concentración de alcaloides, se evaluó el tipo de homogenización más apropiado para la extracción de los AQ. En esta etapa se evaluaron tres métodos diferentes de homogenización: con uso de Ultraturrax, por agitación orbital y con baño de ultrasonido, variando tiempos y velocidades en cada caso.

Los resultados obtenidos utilizando el Ultraturrax (Figura 18) mostraron un aumento progresivo en la concentración de AQT al incrementar la velocidad de homogenización, alcanzando valores altos de 2.72% a partir de los 10000 rpm a 30 segundos y de 2.44% a partir de los 15000 rpm a los 60 segundos observándose que la velocidad tuvo un mayor efecto en este método en comparación con el tiempo (Anexo 10 - Tabla A10-7). Esto indica que la alta cizalladura y energía mecánica generada por Ultraturrax facilitan la ruptura celular y liberación de alcaloides en tiempos cortos.

Los resultados obtenidos por este tipo de homogenización no fueron muy reproducibles, observando en general valores altos del coeficiente de variación con un rango de 3.27 a 17.00% respecto a los otros métodos de extracción estudiados; esto podría deberse a la posible pérdida de muestra durante las reextracciones.

Figura 18. Concentración (g AQ/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por Ultraturrax cuantificado por UHPLC-DAD

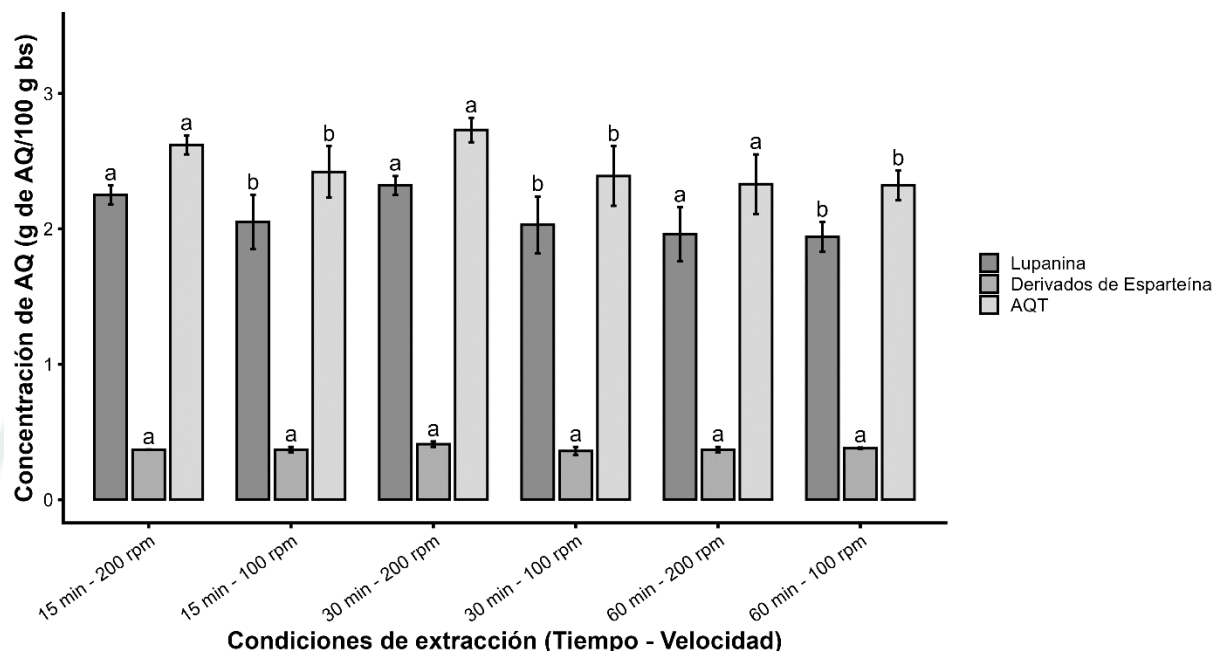


*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales) AQ (Alcaloides quinolizidínicos). Los valores que presentan la misma letra sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey.

En el caso del método con agitación orbital (Figura 19), el tiempo y velocidad influyeron significativamente en los resultados. Una mayor velocidad (200 rpm) permitió obtener un mayor contenido de AQT independiente del tiempo de extracción. La extracción máxima se obtuvo a 200 rpm y 30 minutos con un valor de AQT de 2.73% (Anexo 10 – Tabla 10-8), similar al valor alcanzado con Ultraturrax a 30 segundos y 20000 rpm. Sin embargo, la extracción con agitación a 60 minutos presentó una ligera disminución, sugiriendo que tiempos prolongados

podrían ocasionar degradación o pérdidas por reacciones secundarias; además se puede evidenciar que un equilibrio entre tiempo y velocidad es fundamental para optimizar la extracción (94,95).

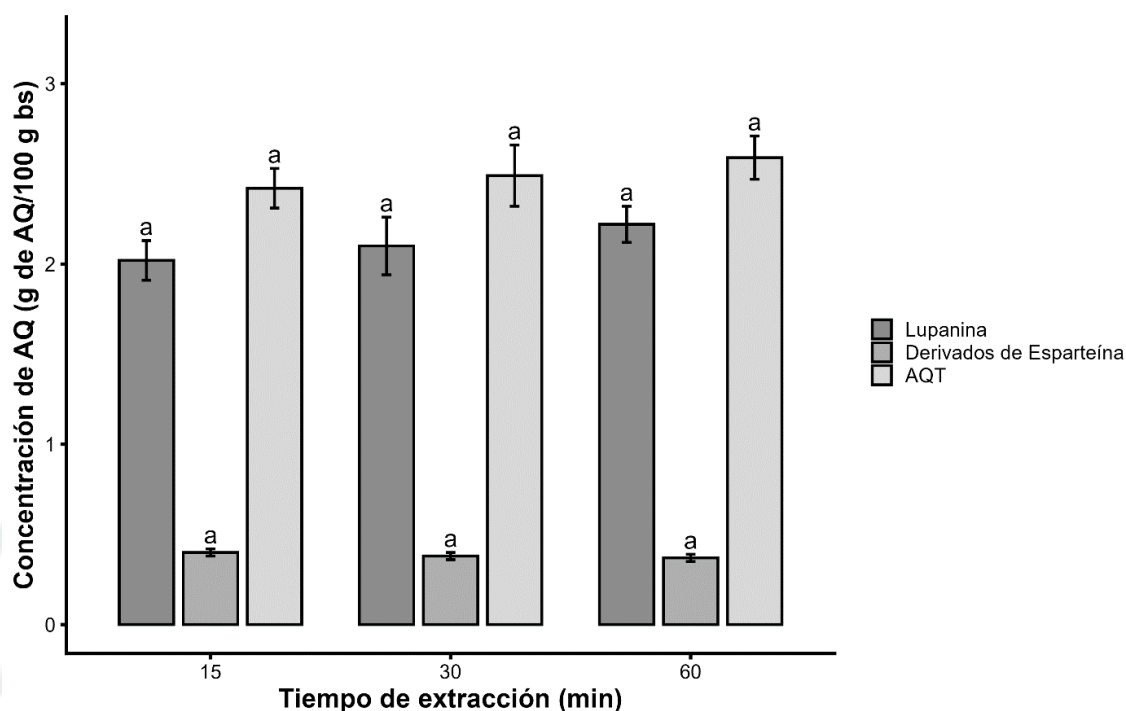
Figura 19. Concentración (g AQ / 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por agitación orbital, cuantificado por UHPLC-DAD



*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales) AQ (Alcaloides quinolizidínicos). Los valores que presentan la misma letra sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey.

En la Figura 20 se presentan los resultados obtenidos cuando la extracción de AQ se realizó utilizando un baño de ultrasonido a diferentes tiempos. Se observó un aumento leve pero no significativo en la concentración de alcaloides con relación al tiempo, alcanzando su máximo a los 60 minutos con un valor promedio de AQT de 2.59% y lupanina en 2.22% (Anexo 10 – Tabla A10-9). El principio de extracción con uso de ultrasonido consiste en la inducción de la ruptura celular mejorando la liberación de compuestos bioactivos a lo largo del tiempo (96).

Figura 20. Concentración (g AQ / 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por baño de ultrasonido, cuantificado por UHPLC-DAD



*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales) AQ (Alcaloides quinolizidínicos). Los valores que presentan la misma letra sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey o Dunn según corresponda.

Hwang et al. (84), reportó valores de lupanina en *Lupinus angustifolius* L., entre 3.08% y 3.80% para tiempos de 5 a 120 min empleando una extracción con agitación orbital, mientras que para la extracción asistida por ultrasonido registraron rangos ligeramente menores de 3.04% a 3.75% de lupanina considerando un tiempo de 5 a 120 min. Además, indicaron que la extracción de los AQ asistida por sonicación fue completa a los 60 min con una concentración de lupanina igual a 3.76%. En el presente estudio se obtuvo una mayor concentración de AQ cuando la extracción se realizó con agitación orbital a los 30 min a 200 rpm con un valor promedio de 2.32% para lupanina y para derivados de esparteína un valor de 0.41%; mientras que para la extracción con baño ultrasonido, a los 60 min se obtuvieron valores ligeramente menores de lupanina y derivados de esparteína de 2.22% y 0.37%, respectivamente respecto al método anterior.

Es probable que Hwang et al. (84) utilizaran parámetros operativos de ultrasonido (frecuencia, potencial ultrasónico, intensidad de agitación, temperatura, etc) diferentes a los aplicados en el presente trabajo, los cuales permitieron una mejor extracción de los AQ, sin embargo, estas variables no fueron reportadas en ese estudio.

En base a los hallazgos obtenidos, se seleccionó la agitación orbital por 30 minutos y 200 rpm como los parámetros más adecuados en la primera etapa de extracción de los AQ por el método de Muzquiz (78); por permitir una extracción eficaz de los AQ, además por ser una alternativa más corta en comparación con la sonicación y reportando en valores más reproducibles comparación con el método con Ultraturrax.

Es importante mencionar que, durante el desarrollo del análisis, se evidenció una pérdida ligera en la capacidad de retención de la columna C18, posiblemente atribuida al uso continuo de la misma con una fase móvil compuesta por 100% agua. Esta fase fue la que se utilizó para el análisis cromatográfico de lupanina. Debido a que los experimentos de extracción correspondientes a cada etapa (según Tabla 6) se realizaron al mismo tiempo en cada caso, procediendo con el análisis inmediato por UHPLC-DAD apenas obtenidos los extractos, los resultados por efecto de las variables evaluadas en cada etapa no fueron afectados; sin embargo, esto representa una consideración técnica importante para futuros análisis.

3.4. Análisis del contenido y perfil de AQ por UHPLC-DAD en cinco variedades de tarwi

Para llevar a cabo este análisis, se optó por utilizar una columna cromatográfica KINETEX EVO C18, debido a que según sus características técnicas presenta una alta estabilidad con fases móviles acuosas respecto a una columna C18 convencional. Además, la columna EVO C18 presenta un rango de pH amplio (1–12), lo que permite trabajar en condiciones más variadas sin comprometer la integridad de la fase estacionaria. En la práctica, estas características contribuyen a una mejor forma de pico y a una mayor reproducibilidad en los resultados obtenidos (80). Asimismo, se construyeron las respectivas curvas de calibración específicas, utilizando estándares de lupanina y esparteína (Anexo 9). La extracción de los AQ se realizó aplicando las condiciones que permitieron una mejor extracción de estos compuestos, utilizando la muestra sin desgrasar con una proporción de 1/5 aplicando TCA 5% con agitación orbital a 200 rpm por 30 min.

3.4.1. Contenido de alcaloides quinolizidínicos totales

En una primera etapa se compararon dos métodos de cuantificación de AQT en cinco variedades comerciales de tarwi. En la Figura 21 se presentan los resultados obtenidos aplicando el método de Muzquiz adaptado (que sigue el protocolo de extracción de Muzquiz (78), pero con detección por espectrofotometría), y el método donde se mejoraron diferentes condiciones de extracción según Muzquiz (78), pero cuantificando los AQ por UHPLC-DAD.

Adicionalmente, se realizó el análisis por el método de cuantificación espectrofotométrico por Von Baer (77) solo con fines comparativos los resultados se observan en el Anexo 10 – Tabla A10-10.

Respecto al efecto del método, se observó un patrón consistente en todas las variedades; donde el método de Muzquiz adaptado presentó los mayores valores de AQT (3.31 a 3.81% bs), mientras que el método de Muzquiz optimizado y con detección por UHPLC-DAD reportó concentraciones más bajas (2.89 a 3.41% bs) (Anexo 10 – Tabla A10-11). Las diferencias entre métodos dentro de cada variedad fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$), evidenciando la influencia del principio analítico sobre la cuantificación de los AQT, estas diferencias se pueden atribuir a la selectividad, especificidad y posible cuantificación de interferentes en métodos no cromatográficos.

Los valores más altos de AQT obtenidos con el método de Muzquiz adaptado comparado con el método espectrofotométrico convencional (77) confirma que la extracción de estos compuestos es mejor cuando se aplica solución acuosa ácida en una primera etapa, para luego solubilizarlos con solvente orgánico en medio alcalino, respecto a sólo una extracción con cloroformo (6,92).

En cuanto a la variedad (Figura 22), se observaron diferencias significativas dentro de cada método, evidenciando una tendencia decreciente en el contenido de AQT siguiendo el siguiente orden: TY, TAG, TA, TPG y TCF en los 3 métodos. La variedad TY presentó los mayores valores (3.41 a 3.81% bs), mientras que TCF registró los más bajos (2.89 a 3.31% bs). Las variedades TAG y TA mostraron valores intermedios, con comportamientos parcialmente similares entre sí, mientras que TPG se ubicó en un nivel inferior, diferenciándose estadísticamente de la de mayor contenido (TY).

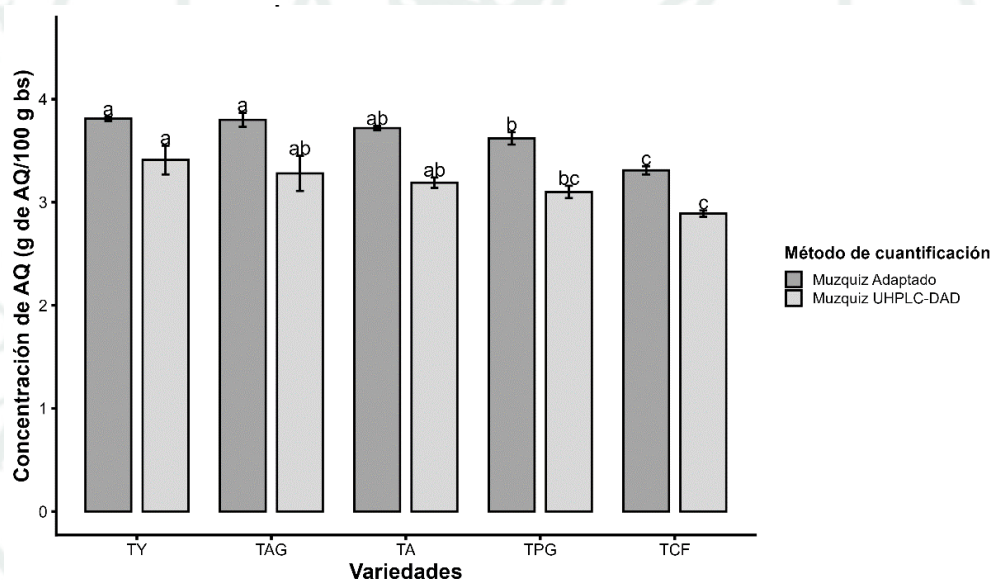
Los resultados confirman que ambos factores evaluados ejercen un efecto significativo sobre la cuantificación de AQT, evidenciando que la elección del método analítico influye directamente en los valores obtenidos, mientras que la variabilidad observada con respecto al contenido de estos compuestos está asociada intrínsecamente a la variedad.

El método espectrofotométrico permite la determinación indirecta de los AQT, basándose en la formación de un complejo ion-par entre los alcaloides y el púrpura de bromocresol (BKP). En un medio básico (KOH 15%), los alcaloides se encuentran en su forma libre (no protonada), facilitando su extracción hacia una fase orgánica (CHCl_3); luego el BKP, al actuar como colorante ácido, interactúa con los AQT formando un complejo coloreado. Además, la ecuación propuesta por Von Baer (77) para los cálculos de AQT utiliza factores de calibración diferentes según el tipo de alcaloide, sin embargo, los AQT se expresan en función

al tipo de alcaloide mayoritario. Para el caso del tarwi, la lupanina es el AQ que se encuentra en mayor concentración (19) y los pocos trabajos donde aplicaron el método espectrofotométrico expresan los AQT como lupanina.

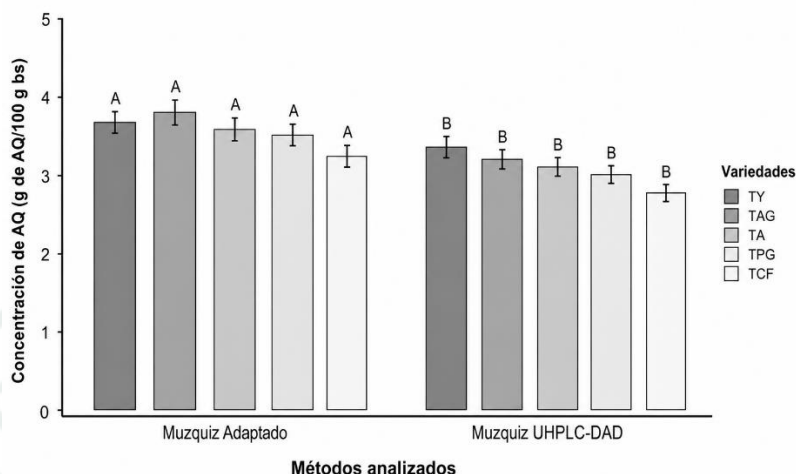
Este método no es exacto debido a que no permite distinguir entre el tipo de AQ presente, y podría estar sobreestimando los valores reales al utilizar un único factor de calibración en el cálculo. La determinación por UHPLC-DAD sería más exacta ya que permite diferenciar entre tipos de AQ según sus espectros de absorción específicos (Figura 23 y Figura 24), y utilizar curvas de calibración según el tipo de AQ para su adecuada cuantificación. En estudios previos, también se ha evidenciado que los métodos espectrofotométricos presentan limitaciones frente a técnicas cromatográficas (6,56,68,85). Esto refuerza la importancia de utilizar técnicas de mayor precisión, especialmente cuando se busca establecer perfiles químicos detallados.

Figura 21. Concentración de alcaloides quinolizidínicos totales en g/100 g bs comparando las 5 variedades de tarwi obtenidos mediante dos métodos de cuantificación



*TY (Tarwi Yunguyo) – TAG (Tarwi Alta Gracia) – TA (Tarwi Andenes) – TPG (Tarwi Paton Grande) – TCF (Tarwi Cholo Fuerte). Los valores que presentan las mismas letras sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey o Dunn según corresponda.

Figura 22. Concentración de alcaloides quinolizidínicos totales en g/100 g bs comparando los métodos de cuantificación de las 5 variedades de tarwi



*TY (Tarwi Yunguyo) – TAG (Tarwi Alta Gracia) – TA (Tarwi Andenes) – TPG (Tarwi Paton Grande) – TCF (Tarwi Cholo Fuerte). Los valores que presentan las mismas letras sobre las mismas barras no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey.

Al comparar los resultados obtenidos con estudios previos, Quispe (6) utilizó el mismo método espectrofotométrico para evaluar los AQT en variedades de tarwi peruanas y obtuvo resultados con una tendencia similar a los del presente estudio. En dicho estudio, la variedad TY también presentó la mayor concentración de alcaloides con un valor de 2.98%, mientras que las variedades TCF y TA mostraron los valores más bajos, con un total de 2.41% y 2.39% bs, respectivamente, encontrándose por debajo de las concentraciones obtenidas en este estudio. Estas diferencias encontradas pueden atribuirse a factores diferentes al tipo de método analítico utilizado; como la procedencia de las variedades, las condiciones climáticas de cultivo en cada caso o la manipulación post-cosecha, lo cual debería ser investigado en estudios a futuro.

Para una mejor comparación, es importante considerar tanto el origen de la muestra como el método analítico en la evaluación de estos compuestos.

3.4.2. Análisis del contenido y perfil de AQ por UHPLC-DAD

En la Figura 23 y Figura 24 se muestran los perfiles cromatográficos de los principales AQ detectados en la variedad TY por UHPLC-DAD, mientras que en la Tabla 18 se presentan las características de los espectros de absorción UV-VIS de cada pico detectado, donde se puede distinguir los principales AQ (lupanina y esparteína) en función de su tiempo de retención (R_t) y su máxima absorción espectral (λ). Las variedades en estudio presentaron cromatogramas similares variando en las áreas y consecuentemente en las concentraciones de cada compuesto.

El principal AQ identificado en todas las variedades de tarwi fue la lupanina, además, se detectó un pico pequeño con una longitud de onda de máxima absorción igual al del estándar de lupanina ($\lambda=203.76$ nm), pero en un tiempo de retención diferente ($R_t=1.003$), el cual posiblemente se trate de un isómero de lupanina al cual se le denominó “derivado de lupanina”. Por otro lado, el alcaloide esparteína, el cual es el segundo AQ más importante en el tarwi (19) se detectó a 305 nm (Figura 24) a esta misma longitud de onda, se encontraron entre 2 a 3 picos en las muestras de tarwi; sin embargo, sus espectros de absorción UV-VIS fueron diferentes al presentado por el estándar de esparteína (Tabla 8). A pesar de estas diferencias, la forma del espectro de absorción fue parecida al del estándar, por lo que podrían tratarse de posibles isómeros de esparteína o de otros AQ similares, por este motivo, se les identificó y cuantificó como “derivados de esparteína”.

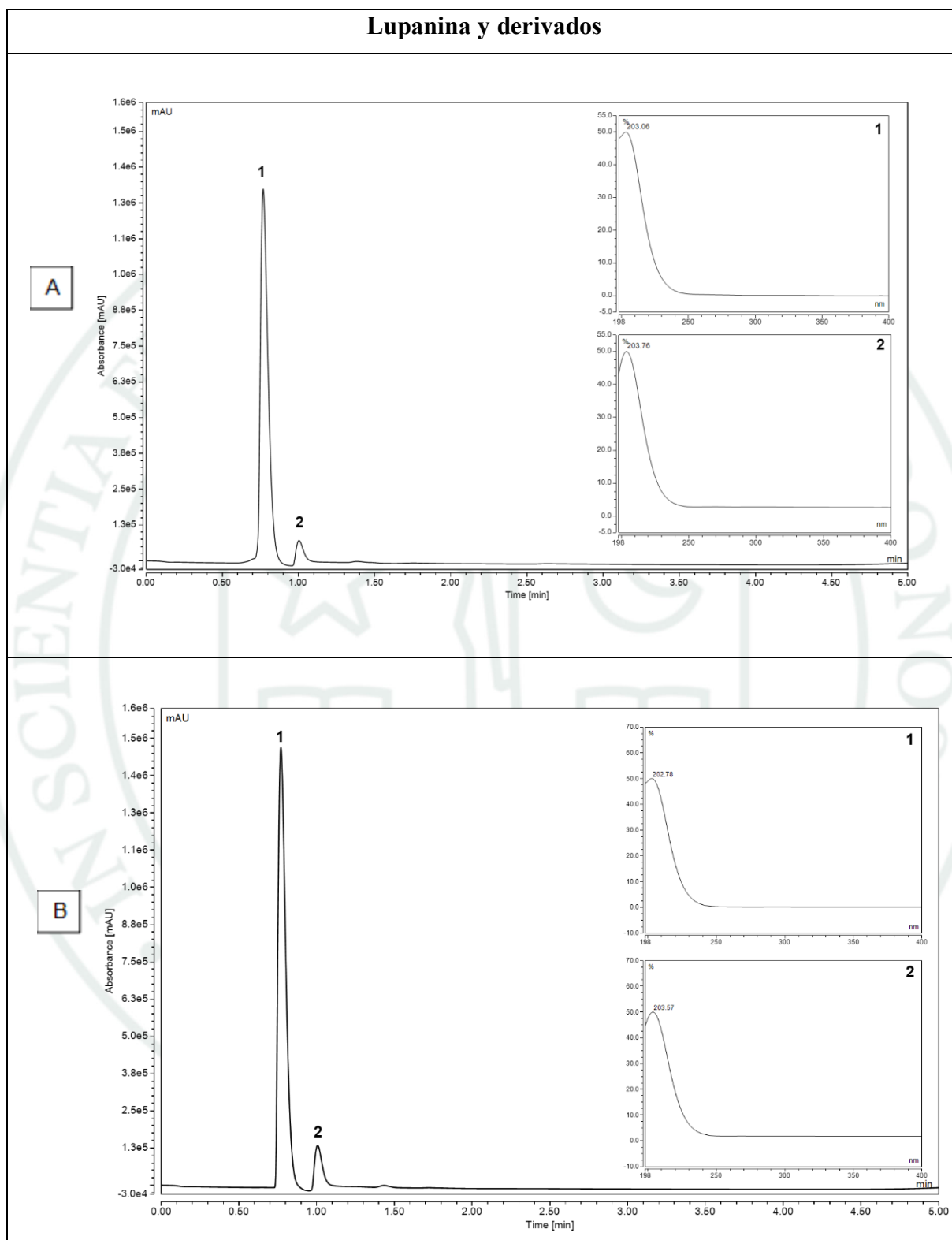
Cabe destacar que todas las variedades analizadas presentaron el mismo patrón cromatográfico en el grupo de la lupanina, con un pico principal bien definido y la presencia de picos secundarios consistentes. En cambio, para los derivados de esparteína, se observaron ligeras variaciones entre muestras, ya que en algunas se identificaron solo dos picos en lugar de tres, lo que podría deberse a diferencias por efecto de la variedad.

Hasta la fecha, los estudios que detallan cromatogramas y espectros de absorción específicos para los alcaloides del tarwi son escasos, por lo que los resultados obtenidos aportan información valiosa para futuras investigaciones. En particular, la coincidencia espectral de las muestras con el estándar de lupanina refuerza su identificación como compuesto principal, mientras que la variabilidad en los derivados de esparteína abre la posibilidad de explorar con mayor profundidad su perfil estructural y funcional.

Tabla 8. Cromatogramas, tiempos de retención, compuesto identificado y longitud de onda de máxima absorción de los espectros de compuestos detectados en la variedad Yunguyo presentadas en las Figuras 13 y 14.

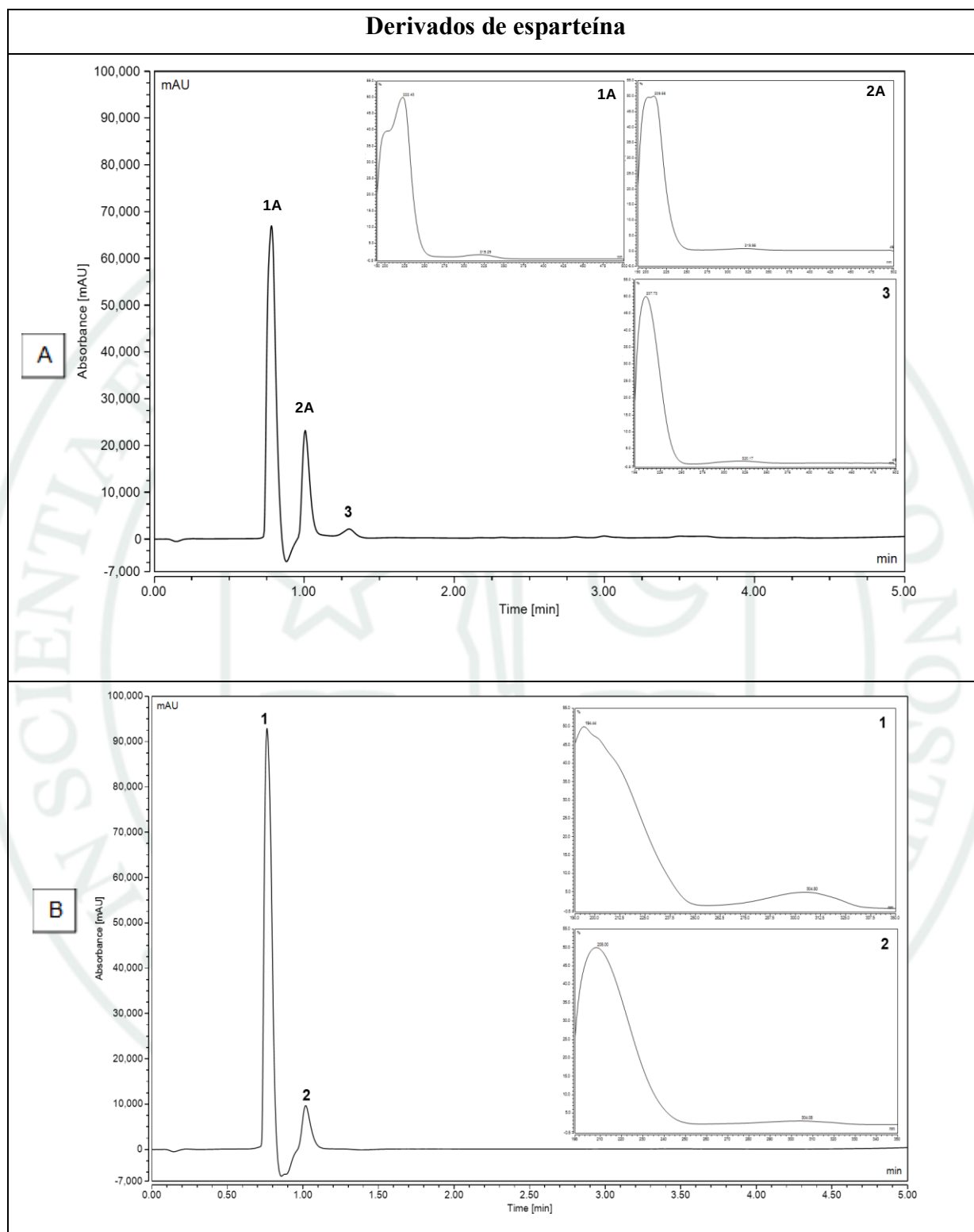
Lupanina y derivados				
Cromatogramas	Nº Pico	Tiempo de retención (min)	Compuesto	λ (nm)
A	1	0.768	Lupanina	203.06
	2	1.003	Derivado de Lupanina	203.76
B	1	0.770	Lupanina	202.78
	2	1.007	Derivado de lupanina	203.57
Esparteína y derivados				
A	1A	0.782	Derivado de Esparteína	202.12, 222.43, 319.29
	2A	1.013	Derivado de Esparteína	209.66, 319.95
	3	1.298	Derivado de Esparteína	207.73, 320.17
B	1	0.763	Esparteína	194.44, 304.80
	2	1.018	Derivado de Esparteína	208, 304.08

Figura 23. Perfil cromatográfico a 205 nm de Lupanina (1) y derivado de Lupanina (2) de la variedad Tarwi Yunguyo (A) y estándar de Lupanina a 250 ppm (B).



* Elaboración propia.

Figura 24. Perfil cromatográfico a 305 nm de derivados de Esparteína (1A)(2A)(3) de la variedad Tarwi Yunguyo (A), y estándar de Esparteína 500 ppm (B).



* Elaboración propia.

La cuantificación individual de alcaloides quinolizidínicos mediante UHPLC-DAD en las cinco variedades de tarwi (Figura 25) permitió identificar y comparar los niveles de lupanina, derivados de lupanina, derivados de esparteína y los AQT (Anexo 10 – Tabla 10A-12).

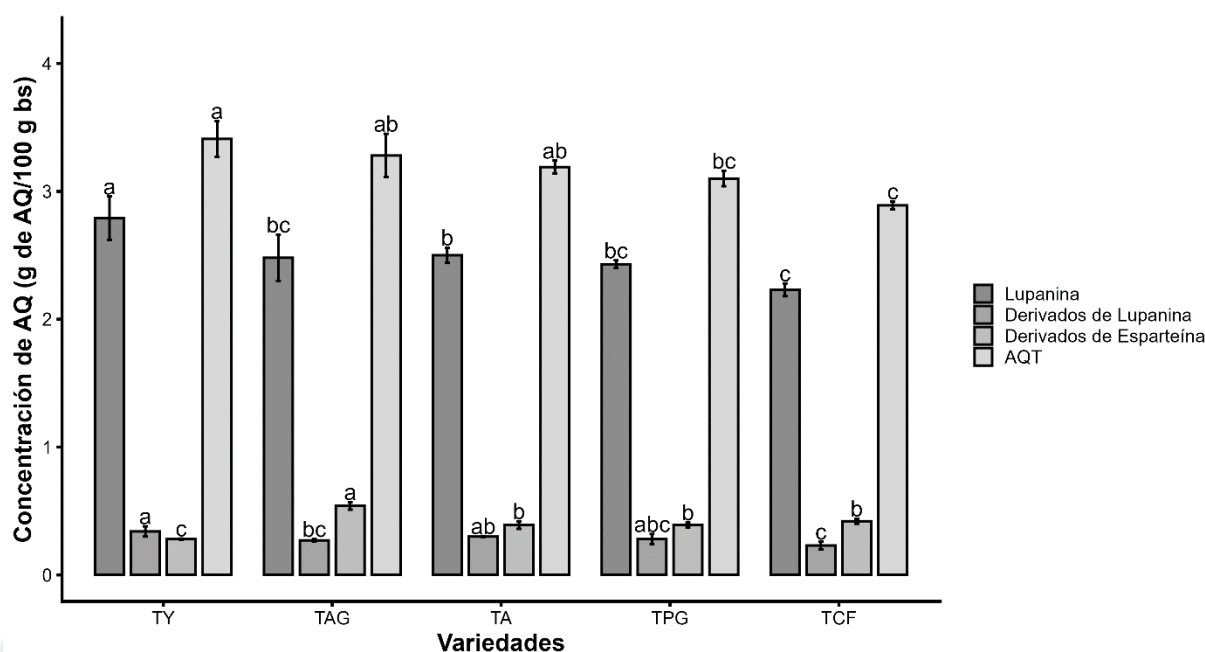
En general, la variedad TY presentó la mayor concentración total de AQT con 3.41%, seguida de TAG (3.28%), TA (3.19%) y TPG (3.10%), mientras que la menor concentración se observó en TCF con 2.89%; en cuanto a la lupanina alcanzó su valor máximo en la variedad TY ($2.79 \pm 0.17\%$) y el más bajo en TCF ($2.23 \pm 0.05\%$), lo cual concuerda con estudios previos que señalan a la lupanina como el principal compuesto en *Lupinus mutabilis*.

En cuanto a los derivados de lupanina, se detectaron niveles variables entre 0.23 y 0.34%, siendo más altos en TY y TCF. Respecto a los derivados de esparteína, se observó una mayor variabilidad entre variedades, alcanzando su mayor valor en TAG con un promedio de $0.54 \pm 0.03\%$, siendo superior al TY; mientras que el resto de variedades (TA, TPG y TCF) no mostraron diferencias marcadas entre ellas.

Comparando estos resultados con los reportados por Cortés-Avendaño et al. (85), quienes cuantificaron los alcaloides por GC-MS, se observa que algunas variedades, como TA, presentaron concentraciones más elevadas (5.15% bs), en contraste con los valores obtenidos en el presente trabajo. Además, las variedades como TPG y TAG mostraron valores más altos de 4.85 y 4.72% bs, respectivamente; mientras que la variedad TY presentó el valor más bajo (3.98% bs) (85).

Asimismo, Bryson (68) mediante la cuantificación de AQ por GC-FID, evaluó dos tipos de variedad Andenes: Andenes INIA-Cusco y Andenes-80 de Ancash, reportando valores de 5.38% y 2.38% bs, respectivamente; observándose diferencias significativas dentro de una misma variedad, asociadas posiblemente a su procedencia y/o a la variación de las condiciones ambientales de cultivo (97,98); esto podría explicar las diferencias encontradas entre los valores de AQ del presente estudio con aquellos presentados por Cortés-Avendaño et al. (85) y Bryson (68) a pesar de tratarse de la misma variedad. La información sobre la zona de cultivo de las semillas de tarwi analizados no fue proporcionada por el Programa Investigación y Proyección Social (PIPS) en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), La Molina, Lima, Lima.

Figura 25. Concentración de alcaloides quinolizidínicos en g/100 g bs de 5 variedades de tarwi



*AQT (Alcaloides quinolizidínicos). Los valores que presentan la misma letra sobre una barra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey.

Estas diferencias evidenciadas tanto en Cortés-Avendaño et al. (85) como en Bryson (68) pueden atribuirse a la técnica de extracción, tipo de detección y condiciones instrumentales utilizadas, además, de las condiciones ambientales durante el cultivo y la variedad genética (97,98).

Además de los AQ lupanina y esparteína, de acuerdo a la literatura también se han identificado al menos 22 número de AQ minoritarios, como por ejemplo: oxo-esparteína dihidroxilupanina, 3-hidroxilupanina, 13-hidroxilupanina, multiflorina, α -Isolupanina, anagirina, tetrahidrorhombifolina, entre otros (19,85); los cuales no pudieron ser detectados con el método por UHPLC-DAD en la presente investigación, debido a la falta de estándares comerciales, y a la casi inexistente información sobre los espectros UV-VIS de los otros AQ diferentes a la lupanina y esparteína.

Un análisis por LC-MS permitiría identificar la diversidad de AQ presentes en el tarwi según sus perfiles de masas, los cuales son característicos para cada compuesto, así como ha sido reportado por Farag et al. (99), Zareena et al. (100) y Tawfeek et al. (101) y por lo tanto su cuantificación aumentaría los valores finales de AQT; sin embargo, esto requiere estudios posteriores utilizando esa plataforma analítica.

Con el fin de evaluar la posible relación entre las características físicas y la composición química de las semillas, se realizó la correlación de Pearson entre el índice de color (CI) y el

contenido de AQT determinado por UHPLC-DAD. El análisis mostró un coeficiente de correlación positivo ($r = 0.3771$) pero no fue estadísticamente significativo ($p = 0.1012$), lo que indica que no es posible establecer una relación concluyente entre ambas variables bajo las condiciones del presente estudio. Este resultado podría deberse a que los parámetros de color (utilizados para el cálculo del CI) se midieron directamente en las semillas y no en la muestra molida, por lo que serían necesarios ensayos adicionales para confirmar esta relación.

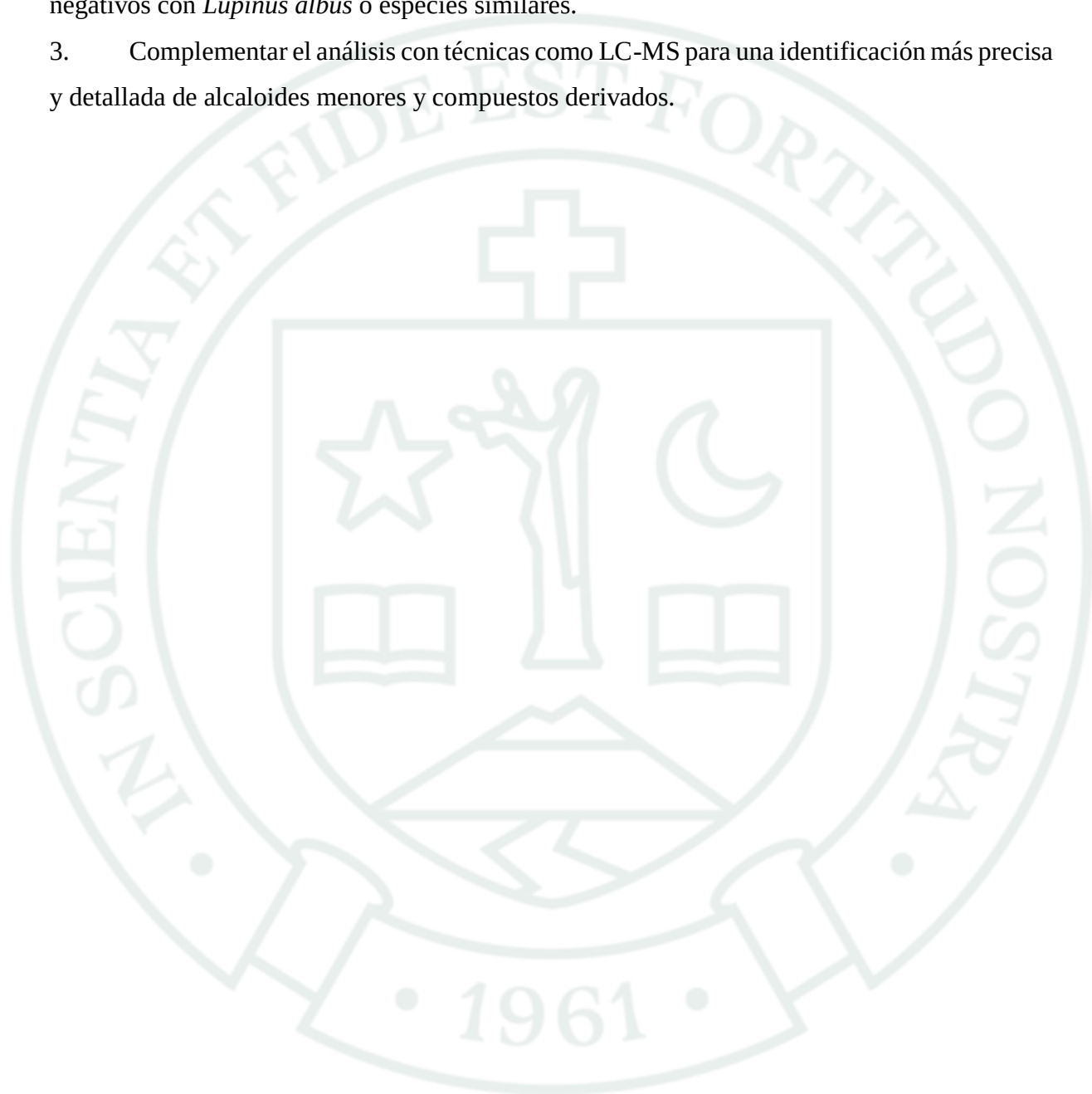
Asimismo, otros factores como la variabilidad genética entre variedades, diferencias en las condiciones de cultivo, el grado de madurez y el procesamiento postcosecha (97,98) pueden afectar tanto el perfil de color como la concentración y perfil de alcaloides entre variedades de tarwi o aún dentro de una misma variedad. En este sentido, diversos estudios han reportado que la acumulación de metabolitos secundarios en especies vegetales puede variar considerablemente en función de condiciones ambientales como temperatura, radiación solar y disponibilidad hídrica (97).

CONCLUSIONES

1. Se logró optimizar la extracción de los alcaloides quinolizidínicos del tarwi (*Lupinus mutabilis*) y su análisis mediante espectrofotometría y UHPLC-DAD, mejorando la eficiencia de recuperación y la selectividad del método, lo que permitió una determinación precisa, reproducible y confiable de estos compuestos para su caracterización cualitativa y cuantitativa.
2. La caracterización físico-morfológica de las cinco variedades de tarwi (Andenes-TA, Yunguyo-TY, Alta gracia-TAG, Cholo fuerte-TCF, Paton grande-TPG) evidenció diferencias significativas en el peso de 100 semillas, dimensiones y parámetros de color. La variedad TPG presentó el mayor peso (29.73 ± 0.46 g) en comparación con las demás variedades. Los parámetros a^* y b^* indicaron tonalidades rojizas y amarillentas en todas las muestras, mientras que el CI varió entre 2.26 y 2.52.
3. El método de extracción de Muzquiz adaptado (extracción en dos etapas en medio ácido y alcalino), presentó la mayor concentración de alcaloides quinolizidínicos totales en la muestra sin desengrasar (MSD) ($3.94 \pm 0.02\%$ bs), seguido del método espectrofotométrico ($3.28 \pm 0.04\%$ bs) y el método volumétrico ($3.06 \pm 0.05\%$ bs) (estos últimos basados en sólo una extracción con cloroformo).
4. Las mejores condiciones extracción de AQ con el método de Muzquiz (específico para AQ) y con detección por UHPLC-DAD fueron el uso de una proporción peso/volumen de 1/5, como solvente de extracción el TCA 5% y bajo agitación orbital a 200 rpm durante 30 minutos. Este método permitió diferenciar a la lupanina como AQ principal en tarwi, lo que no es posible con los métodos volumétrico y espectrofotométrico que sólo permiten cuantificar AQT. Además, mejoró la cuantificación de AQT de 2.85% a 3.53% aplicando una menor proporción de P/V y la implementación de la cuantificación por UHPLC-DAD.
5. La extracción optimizada de AQ seguida del análisis por UHPLC-DAD permitió identificar y cuantificar los principales alcaloides quinolizidínicos presentes en cinco variedades de tarwi, siendo la lupanina el compuesto mayoritario en todas las muestras, identificándose también algunos compuestos derivados de lupanina y esparteína presente en menor concentración. La variedad TY (Tarwi Yunguyo) presentó la mayor concentración total de alcaloides ($3.41 \pm 0.14\%$ bs), con un contenido de lupanina de $2.79 \pm 0.17\%$ bs, un derivado de lupanina con $0.34 \pm 0.04\%$ bs y entre 2 y 3 derivados de esparteína con una concentración de $0.28 \pm 0.004\%$ bs.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar las propiedades farmacológicas de los alcaloides y su posible relación con su concentración.
2. Validar el método UHPLC-DAD, estableciendo límites de detección y usando controles negativos con *Lupinus albus* o especies similares.
3. Complementar el análisis con técnicas como LC-MS para una identificación más precisa y detallada de alcaloides menores y compuestos derivados.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Suca GR, Suca CA. Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) como futura fuente proteínica y avances de su desarrollo agroindustrial. *Rev Peru Quím Ing Quím*. 2015;18(2):55-71.
2. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Producción y comercio del Tarwi - MIDAGRI. 2023.
3. Villacrés E, Quelal MB, Fernández E, et al. Impact of debittering and fermentation processes on the antinutritional and antioxidant compounds in *Lupinus mutabilis* Sweet. *LWT-Food Sci Technol*. 2020;131. doi:10.1016/j.lwt.2020.109745
4. Sven-E. Jacobsen, Mujica Angel. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. 2006;458-82.
5. Carhuallanqui Ávila S, et al. Caracterización del tarwi (*Lupinus mutabilis*) y diseño de un prototipo de desamargador para la reducción de alcaloides. *J Agri-Food Scienc*. 2022;1(1).
6. Quispe Sanca D. Composición de diez genotipos de Lupino (*L. mutabilis* y *L. albus*) desamargados por proceso acuoso. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2015.
7. Schrenk D, Bodin L, et al. Scientific opinion on the risks for animal and human health related to the presence of quinolizidine alkaloids in feed and food, in particular in lupins and lupin-derived products. *EFSA J*. 1 de noviembre de 2019;17(11). doi:10.2903/j.efsa.2019.5860
8. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). Leguminosas: Grano desamargado de chocho. Requisitos. Quito, Ecuador; 2005.
9. Frick KM, Kamphuis LG, et al. Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. *Front Plant Sci*. 31 de enero de 2017;8(January). doi:10.3389/fpls.2017.00087
10. Chirinos Arias M. Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potential Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) una planta con potencial nutritivo y medicinal. *Rev Bio Cienc*. 2015;3(3):163-72. doi:10.15741/revbio.03.03.03
11. Czubinski J, Grygier A, Siger A. *Lupinus mutabilis* seed composition and its comparison with other lupin species. *J Food Compos Anal*. 1 de junio de 2021;99. doi:10.1016/j.jfca.2021.103875
12. Wiedemann M, Gurrola Díaz CM, Vargas Guerrero B, Wink M, García López PM, Düfer M. Lupanine improves glucose homeostasis by influencing KATP channels and insulin gene expression. *Molecules*. 20 de octubre de 2015;20(10):19085-100. doi:10.3390/molecules201019085 PubMed PMID: 26492234.
13. Pugsley K M, et al. The cardiac electrophysiological effects of sparteine and its analogue BRB-I-28 in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1995;319-27.
14. Villalpando Vargas F, Medina Ceja L. Sparteine as an anticonvulsant drug: Evidence and possible mechanism of action. *Seizure Eur J Epilepsy*. 1 de julio de 2016;39:49-55. doi:10.1016/j.seizure.2016.05.010 PubMed PMID: 27262285.
15. Hidalgo M, Marrufo Asmat P, et al. Evaluación de la susceptibilidad in vitro a esparteína, en cuatro cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2022;39(1):77-82. doi:10.17843/rpmesp.2022.391.10136 PubMed PMID: 35766744.
16. Tapia Núñez M. El tarwi, Lupino Andino. Tarwi, Tauri o Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). 2015.
17. Barda MS, Chatzigeorgiou T, Papadopoulos GK, Bebeli PJ. Agro-morphological evaluation of *Lupinus mutabilis* in two locations in Greece and association with insect pollinators. *Agriculture*. 1 de marzo de 2021;11(236). doi:10.3390/agriculture11030236

18. Villacrés E, Álvarez J, Rosell C. Effects of two debittering processes on the alkaloid content and quality characteristics of lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). J Sci Food Agric. 30 de marzo de 2020;100:2166-75. doi:10.1002/jsfa.10240 PubMed PMID: 31901131.
19. Carvajal-Larenas FE, Linnemann AR, Nout MJR, Koziol M, van Boekel MAJS. *Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. Crit Rev Food Sci Nutr. 3 de julio de 2016;56(9):1454-87. doi:10.1080/10408398.2013.772089 PubMed PMID: 26054557.
20. Garay Canales O. El tarwi alternativa para la lucha contra la desnutrición infantil. Huancayo, Perú: Ministerio de Agricultura y riego – INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria); 2015.
21. Castillo Cuadros KS, Linares Pantigoso AP. Estudio de factibilidad en la instalación de una planta piloto para la industrialización del tarwi como producto final en galletas en la ciudad de Arequipa. [Arequipa]: Universidad Católica de Santa María; 2004.
22. Prins U, van Haren R. Andean lupin (*Lupinus mutabilis*) cropping and its opportunities for Europe. 2019.
23. Rayo Flores C. Los alcaloides del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y su uso en el control de malezas de costa. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2020.
24. Taco Taype N, Zúñiga Dávila D. Effect of inoculation of Tarwi plants with *Bradyrhizobium* spp. Strains isolated from a wild lupine, under greenhouse conditions. Rev Peru Biol. 2020;27(1):35-42. doi:10.15381/rpb.v27i1.17577
25. Villanueva Mendoza C. Rendimiento de ecotipos regionales y variedades de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el valle del Mantaro, Jauja, Junín. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2020.
26. Tapia ME, Fries AM. Guía de campo de los cultivos andinos. 1. ed. Lima: FAO [u.a.]; 2007. 209 p.
27. Soblechero E, Hernanz A, Antón N, Durán JM. La semilla y su morfología. Rev Agropecu Ganad. 2005;612-5.
28. Matilla ÁJ. Desarrollo y germinación de las semillas. En: Azcón Bieto J, Talón M, editores. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw Hill; 2008. p. 537-58.
29. Peralta I E, Caicedo V C. El chocho: proteína vegetal y potencial económico. INIAP. 2000;9-11.
30. Briceño Berru L, Glorio-Paulet P, et al. Chemical Composition, Tocopherol and Carotenoid content of seeds from different Andean Lupin (*Lupinus mutabilis*) ecotypes. Plant Foods Hum Nutr. 2021;(76):98-104. doi:10.1007/s11130-021-00880-0/Published
31. Ferchichi N, Toukabri W, Vrhovsek U, Nouairi I, Angeli A, Masuero D, et al. Proximate composition, lipid and phenolic profiles, and antioxidant activity of different ecotypes of *Lupinus albus*, *Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius*. J Food Meas Charact. 2021;15:1241-57. doi:10.1007/s11694-020-00722-8
32. Sujak A, Kotlarz A, Strobel W. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. Food Chem. 2006;98(4):711-9. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.036
33. Petkova Z, Antova G, Angelova-Romova M, Todorova I, Stoyanova M, Stoyanova A. *Lupinus angustifolius* L. cultivar «Boregine» from South of Bulgaria: A source of nutrients and natural biologically active components. OCL - Oilseeds Fats Crops Lipids. 2022;29(10). doi:10.1051/ocl/2022003
34. Gutiérrez A, Infantes M, Pascual G, Zamora J. Assessment of the factors in the debittering of tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Agroindustrial Sci. 2016;1:145-9. doi:10.17268/agroind.science.2016.01.17
35. Torres Tello F, Nagata A, Dreifuss Spiegel W. Métodos de eliminación de alcaloides en la semilla de *Lupinus mutabilis* Sweet. XXX. 1980;XXX(2):200-209.

36. Petterson DS, Allen DG, Harris DJ, Powers BM, Duscig LJ. Disposition of lupanine and 13-hydroxylupanine in man. XENOBIOTICA. 1994. p. 933-41.
37. Villacrés E, Rubio A, Egas L, Segovia G. Boletín Divulgativo N°333: Proyecto PFN-03-060 «Usos alternativos del Chocho». Quito, Ecuador: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP; 2006.
38. Zhong L, Fang Z, Wahlqvist ML, Wu G, Hodgson JM, Johnson SK. Seed coats of pulses as a food ingredient: Characterization, processing, and applications. Trends Food Sci Technol. 2018;80:35-42. doi:10.1016/j.tifs.2018.07.021
39. Brandolini A, Glorio-Paulet P, Estivi L, Locatelli N, Cordova-Ramos JS, Hidalgo A. Tocopherols, carotenoids and phenolics changes during Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) seeds processing. J Food Compos Anal. 2022;106. doi:10.1016/j.jfca.2021.104335
40. Goh YX, Jalil J, Lam KW, Husain K, Premakumar CM. Genistein: A Review on its anti-Inflammatory properties. Front Pharmacol. 2022;13. doi:10.3389/fphar.2022.820969
41. Gómez Aliaga A, Quijada Osorio JL. Evaluación de las características organolépticas del extracto de Tarwi (*Lupinus mutabilis*) semidulce, con adición de oca (*Oxalis tuberosa*) amarilla. [Junín, Perú]: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2013.
42. Bruneton J. Farmacognosia: Fitoquímica plantas medicinales. 2001. 773-859 p.
43. Kuklinski C. Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 2000.
44. Henning CP. Capítulo 2 - Compuestos Secundarios Nitrogenados: Alcaloides. En: Productos naturales vegetales [Internet]. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP); 2013. p. 18-61. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/155455>
45. Robledo P. Las anfetaminas. Vol. 10. 2008;10:166-74.
46. Schryvers S, Arinzechukwu C, Miserez B, Eeckhout M, Jacxsens L. The fate of quinolizidine alkaloids during the processing of lupins (*Lupinus* spp.) for human consumption. Food Chem. 2023;429. doi:10.1016/j.foodchem.2023.136847 PubMed PMID: 37473631.
47. Zhang J, Liu YQ, Fang J. The biological activities of quinolizidine alkaloids. En: Alkaloids: Chemistry and Biology [Internet]. Academic Press Inc.; 2023. p. 1-37. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2022.06.001> doi:10.1016/bs.alkal.2022.06.001
48. Mancinotti D, Frick KM, Geu-Flores F. Biosynthesis of quinolizidine alkaloids in lupins: mechanistic considerations and prospects for pathway elucidation. Nat Prod Rep. 18 de marzo de 2022;39(7):1423-37. doi:10.1039/d1np00069a PubMed PMID: 35302146.
49. Baylor Hidalgo LR. Desarrollo de un método no invasivo por Espectroscopía dieléctrica de microondas para la cuantificación de lupanina en diferentes matrices de *Lupinus mutabilis* (Tarwi) empleando UHPLC acoplado a un espectrofotómetro Masa/masa. [Juliaca, Perú]: Universidad Nacional de Juliaca; 2021.
50. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 91471, Lupanine. [Internet]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lupanine>
51. Parmaki S, Tsipa A, Vasquez MI, et al. Resolution of alkaloid racemate: A novel microbial approach for the production of enantiopure lupanine via industrial wastewater valorization. Microb Cell Factories. 2020;19(1). doi:10.1186/s12934-020-01324-1 PubMed PMID: 32169079.
52. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 644020, Sparteine [Internet]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lupinidine>
53. Wink M, Hartmann T. Enzymatic synthesis of quinolizidine alkaloids in *Lupin* chloroplasts. Z. Naturforsch. 1980. p. 7.

54. Reinhard H, Rupp H, Sager F, Streule M, Zoller O. Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food. *J Chromatogr.* 2006;1112(1-2):353-60. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.079 PubMed PMID: 16359686.
55. De Cortes Sánchez M, Altares P, Pedrosa MM, et al. Alkaloid variation during germination in different lupin species. *Food Chem.* 2005;90(3):347-55. doi:10.1016/j.foodchem.2004.04.008
56. Rosas Quina YE, Mejía Nova FC. Supercritical fluid extraction with cosolvent of alkaloids from *Lupinus mutabilis* Sweet and comparison with conventional method. *J Food Process Eng.* 1 de abril de 2021;44(4). doi:10.1111/jfpe.13657
57. Mirones S, et al. Evaluación de la extracción de alcaloides de la semilla de tarwi (*Lupinus mutabilis*), por microondas, ultrasonido y convencional. *Rev Científica Cienc Agro Aliment.* 2019;1.
58. Estivi L, Buratti S, Fusi D, et al. Alkaloid content and taste profile assessed by electronic tongue of *Lupinus albus* seeds debittered by different methods. *J Food Compos Anal.* 2022;114. doi:10.1016/j.jfca.2022.104810
59. Pilegaard K, Gry J. Alkaloids in edible lupin seeds: A toxicological review and recommendations. 2008.
60. Magalhães S, Fernandes F, Cabrita A, et al. Alkaloids in the valorization of European *Lupinus* spp. seeds crop. *Ind Crops Prod.* 2017;95:286-95. doi:10.1016/j.indcrop.2016.10.033
61. Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 2007. 199-218 p.
62. Christian GD. Química Analítica - 6ta Edición. 2009. 158-160 p.
63. Bromocresol Purple | C₂₁H₁₆Br₂O₅S | CID 8273 - PubChem.
64. Yiping L, Zhen H, Langchong H. An approach to develop binary chromatographic fingerprints of the total alkaloids from *Caulophyllum robustum* by high performance liquid chromatography/diode array detector and gas chromatography/mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43(5):1667-72. doi:10.1016/j.jpba.2006.12.028 PubMed PMID: 17291705.
65. Hanqing Wang et al. Comparative analysis of quinolizidine alkaloids from different parts of *Sophora alopecuroides* seeds by UPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;67-68:16-21. doi:10.1016/j.jpba.2012.04.024 PubMed PMID: 22613581.
66. Tawfeek K, Juhász A, Singh KB, Foley R, Nye-Wood MG, Colgrave ML. Development and validation of a rapid and sensitive LC-MS/MS approach for alkaloid testing in different *Lupinus* species. *J Food Compos Anal.* 1 de agosto de 2023;121. doi:10.1016/j.jfca.2023.105391
67. Yucra Mamani YE. Cinética de desamargado del tarwi (*Lupinus mutabilis*) por congelación acoplado con microondas y ultrasonido. [Juliaca, Perú]: Universidad Nacional de Juliaca; 2021.
68. Bryson Cabrera AC. MÉTODOS CUANTITATIVOS (GC-FID) Y CUALITATIVOS (FT-IR). [Lima, Perú]; 2023.
69. INDECOPI. Cereales y menestras. Determinación del contenido de humedad. Método usual. En: Norma técnica Peruana (NTP) 205.002. Lima, Perú; 2011.
70. Córdova-Ramos JS, Glorio-Paulet P, Camarena F, Brandolini A, Hidalgo A. Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): Processing effects on chemical composition, heat damage, and in vitro protein digestibility. *Cereal Chem.* 2020;97(4):827-35. doi:10.1002/cche.10303
71. Briceño Berrú LA. Caracterización fisicoquímica, tocoles, carotenoides y capacidad antioxidante de 20 genotipos de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). [Lima, Perú]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2024.

72. Vera Vega M, Jimenez Davalos J, Zolla G. The micronutrient content in underutilized crops: the *Lupinus mutabilis* sweet case. *Sci Rep.* 2022;12(1). doi:10.1038/s41598-022-19202-8 PubMed PMID: 36071148.
73. Zacarias Chavez A. SELECCIÓN DE LÍNEAS PARA TAMAÑO DE GRANO EN TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet) CICA - FCA - UNSAAC. [Cusco - Perú]: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2020.
74. Mauri Gutierrez YR. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN PARA TAMAÑO DE GRANO DE 79 LÍNEAS DE TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet), BAJO CONDICIONES DEL CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA – CUSCO [Tesis]. [Cusco-Perú]: Univeresidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2024.
75. Norma Técnica Peruana (NTP 209.263). Alimentos cocidos de reconstitución instantánea. Determinación de grasa. Método gravimétrico. 2018.
76. Nielsen SS. Part III: Chemical properties and characteristics of foods. En: Nielsen SS, editor. *Food Analysis* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2010. p. 231-2. (Food Science Texts Series). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1478-1> doi:10.1007/978-1-4419-1478-1
77. Von Baer E. Procedimiento rápido para la determinación de los alcaloides totales en *lupinus mutabilis* con púrpura de bromocresol (BKP). En: *Proyecto Lupino*. Lima, Perú; 1978.
78. Muzquiz M. *Alkaloids: Gas Chromatography*. En. Madrid,España: Academic Press; 2000. p. 1938-49.
79. Lee ST, Cook D, Panter KE, et al. Lupine induced «crooked calf disease» in Washington and Oregon: Identification of the alkaloid profiles in *Lupinus sulfureus*, *Lupinus leucophyllus*, and *Lupinus sericeus*. *J Agric Food Chem.* 2007;55(26):10649-55. doi:10.1021/jf0723110 PubMed PMID: 18038992.
80. KINETEX. Kinetex Core-Shell Technology HPLC/UHPLC Columns.
81. Boschin G, Annicchiarico P, Resta D, D'Agostina A, Arnoldi A. Quinolizidine Alkaloids in Seeds of Lupin Genotypes of Different Origins. *J Agric Food Chem.* 1 de mayo de 2008;56(10):3657-63. doi:10.1021/jf7037218
82. Cely-Veloza W, Quiroga D, Coy-Barrera E. Quinolizidine-Based Variations and Antifungal Activity of Eight *Lupinus* Species Grown under Greenhouse Conditions. *Molecules.* 2022;27(1). doi:10.3390/molecules27010305 PubMed PMID: 35011535.
83. Kamel KA, Świącicki W, Kaczmarek Z, Barzyk P. Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) collection. *Genet Resour Crop Evol.* 2016;63(4):711-9. doi:10.1007/s10722-015-0278-7
84. Hwang IM, Lee HW, Lee HM, et al. Rapid and simultaneous quantification of five quinolizidine alkaloids in *Lupinus angustifolius* l. and its processed foods by UPLC-MS/MS. *ACS Omega.* octubre de 2020;5(33):20825-30. doi:10.1021/acsomega.0c01929
85. Cortés-Avendaño P, Tarvainen M, Suomela JP, Glorio-Paulet P, Yang B, Repo-Carrasco-Valencia R. Profile and Content of Residual Alkaloids in Ten Ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after Aqueous Debittering Process. *Plant Foods Hum Nutr.* junio de 2020;75(2):184-91. doi:10.1007/s11130-020-00799-y
86. Lee HW, Hwang IM, Lee HM, Yang JS, Park EJ, Choi JW, et al. Validation and Determination of Quinolizidine Alkaloids (QAs) in Lupin Products by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection (GC-FID). *Anal Lett.* 3 de marzo de 2020;53(4):606-13. doi:10.1080/00032719.2019.1661423
87. Parra-Gallardo G, Salas-Sanjuán MDC, Del Moral F, Valenzuela JL. Characterising the Nutritional and Alkaloid Profiles of Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) Pods and Seeds at Different Stages of Ripening. *Agriculture.* 14 de octubre de 2024;14(10):1812. doi:10.3390/agriculture14101812

88. Estivi L, Grassi S, Briceño-Berrú L, Glorio-Paulet P, Camarena F, Hidalgo A, et al. Free Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity and FT-NIR Survey of Debittered *Lupinus mutabilis* Seeds. *Processes*. 18 de agosto de 2022;10(8):1637. doi:10.3390/pr10081637
89. Chalampunte-Flores D, Mosquera-Losada MR, Ron AMD, Tapia Bastidas C, Sørensen M. Morphological and Ecogeographical Diversity of the Andean Lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet) in the High Andean Region of Ecuador. *Agronomy*. 4 de agosto de 2023;13(8):2064. doi:10.3390/agronomy13082064
90. Gresta F, Oteri M, Scordia D, Costale A, Armone R, Meineri G, et al. White Lupin (*Lupinus albus* L.), an Alternative Legume for Animal Feeding in the Mediterranean Area. *Agriculture*. 13 de febrero de 2023;13(2):434. doi:10.3390/agriculture13020434
91. Von Baer D, Hartmut Reimerdes E, Feldheim W. Methods for the Determination of Quinolizidine Alkaloids in *Lupinus mutabilis*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1979. p. 27-31.
92. Muzquiz M, Burbano C, Cuadrado C. DETERMINACIÓN DE FACTORES ANTINUTRITIVOS TERMORRESISTENTES EN LEGUMINOSAS. I: ALCALOIDES.
93. Sharma P. Techniques Used in Isolation of Secondary Metabolites. En: *Plant Secondary Metabolites*. India; 2022. p. 179-204.
94. Schryvers S, Arinzechukwu C, Miserez B, Eeckhout M, Jacxsens L. The fate of quinolizidine alkaloids during the processing of lupins (*Lupinus* spp.) for human consumption. *Food Chem.* diciembre de 2023;429:136847. doi:10.1016/j.foodchem.2023.136847
95. Dey P, Kundu A, Kumar A, Gupta M, Lee BM, Bhakta T, et al. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). En: *Recent Advances in Natural Products Analysis* [Internet]. Elsevier; 2020 [citado 11 de abril de 2026]. p. 505-67. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128164556000159> doi:10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9
96. Mounika A, Ilangovan B, Mandal S, Shraddha Yashwant W, Priya Gali S, Shanmugam A. Prospects of ultrasonically extracted food bioactives in the field of non-invasive biomedical applications – A review. *Ultrason Sonochem.* septiembre de 2022;89:106121. doi:10.1016/j.ultsonch.2022.106121
97. Rodés-Bachs C, Van Der Fels-Klerx HJ. Impact of environmental factors on the presence of quinolizidine alkaloids in lupins: a review. *Food Addit Contam Part A*. 3 de junio de 2023;40(6):757-69. doi:10.1080/19440049.2023.2217273
98. Khedr T, Gao LL, Kamphuis LG, Juhász A, Colgrave ML. Intra- and inter-plant variability of quinolizidine alkaloids in narrow-leaf lupin seeds, grown under different day/night cycles. *Heliyon*. febrero de 2025;11(3):e42367. doi:10.1016/j.heliyon.2025.e42367
99. Farag MA, Khattab AR, Maamoun AA, Kropf M, Heiss AG. UPLC-MS metabolome based classification of *Lupinus* and *Lens* seeds: A prospect for phyto-equivalency of its different accessions. *Food Res Int.* 1 de enero de 2019;115:379-92. doi:10.1016/j.foodres.2018.11.003 PubMed PMID: 30599956.
100. Zareena B, Khadim A, Jeelani SUY, Hussain S, Ali A, Musharraf SG. High-Throughput Detection of an Alkaloidal Plant Metabolome in Plant Extracts Using LC-ESI-QTOF-MS. *J Proteome Res.* 6 de agosto de 2021;20(8):3826-39. doi:10.1021/acs.jproteome.1c00111
101. Tawfeek K, Juhász A, Singh KB, Foley R, Nye-Wood MG, Colgrave ML. Development and validation of a rapid and sensitive LC-MS/MS approach for alkaloid testing in different *Lupinus* species. *J Food Compos Anal.* 1 de agosto de 2023;121. doi:10.1016/j.jfca.2023.105391
102. Farag MA, Khattab AR, Maamoun AA, Kropf M, Heiss AG. UPLC-MS metabolome based classification of *Lupinus* and *Lens* seeds: A prospect for phyto-equivalency of its different accessions. *Food Res Int.* 1 de enero de 2019;115:379-92. doi:10.1016/j.foodres.2018.11.003 PubMed PMID: 30599956.

103. Keuth O, Humpf HU, Fürst P. Quinolizidine alkaloids in lupine flour and lupine products from the German retail market and risk assessment of the results regarding human health. *Food Addit Contam Part A*. 4 de mayo de 2023;40(5):667-74. doi:10.1080/19440049.2023.2195954
104. Otterbach SL, Yang T, Kato L, Janfelt C, Geu-Flores F. Quinolizidine alkaloids are transported to seeds of bitter narrow-leaved lupin. Hancock R, editor. *J Exp Bot*. 24 de octubre de 2019;70(20):5799-808. doi:10.1093/jxb/erz334





Anexo 1. Registro de material biológico de tarwi y sus derivados

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 015-2025-INIA-DGIA

Lima, 04 de diciembre de 2025

VISTA: La solicitud s/n recepcionada con fecha 08 de mayo de 2025, presentada por la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** y demás documentos vinculados a dicha solicitud; y,

CONSIDERANDO:

Que, la Constitución Política del Perú de 1993 establece en el artículo 66 que los recursos naturales, renovables y no renovables, son Patrimonio de la Nación, precisando que el Estado es soberano en su aprovechamiento. Asimismo, el artículo 68 prescribe que el Estado está obligado a promover la conservación de la diversidad biológica;

Que, el Convenio sobre la Diversidad Biológica y su acuerdo complementario, el Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se deriven de su utilización; se orientan entre otros, a la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos;

Que, el Régimen Común de Acceso a los Recursos Genéticos aprobado por la Decisión N° 391 de la Comunidad Andina de Naciones tiene por objeto regular el acceso a los recursos genéticos de los Países Miembros y sus productos derivados, señalando en su artículo 16 que, todo procedimiento de acceso requerirá de la presentación, admisión, publicación y aprobación de una solicitud, de la suscripción de un contrato, de la emisión y publicación de la correspondiente Resolución y del registro declarativo de los actos vinculados con dicho acceso. Asimismo, en el artículo 1 de la referida Decisión se define al acceso como la obtención y utilización de los recursos genéticos, de sus productos derivados o de sus componentes intangibles, con fines de investigación, prospección biológica, conservación, aplicación industrial o aprovechamiento comercial, entre otros;

Que, el artículo 38 del citado Régimen Común establece que, una vez adoptado y suscrito el contrato, en unidad de acto, se emitirá la Resolución correspondiente; la que se publicará junto con un extracto del contrato en el Diario o Gaceta Oficial o en un diario de amplia circulación nacional y a partir de ese momento se entenderá perfeccionado el acceso;

Que, el Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados (RARG), aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM, tiene por objeto regular las disposiciones referidas al acceso a los recursos genéticos y sus derivados establecidas en Régimen Común de Acceso a los Recursos Genéticos aprobado por la Decisión N° 391 de la Comunidad Andina de Naciones, en concordancia con lo establecido por el Protocolo de Nagoya sobre el Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se deriven de su utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica;

Que, el RARG en su artículo 12 literal b) establece al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) como Autoridad Nacional Competente para los recursos genéticos y sus derivados de las especies cultivadas o domesticadas continentales, así como los microorganismos asociados a estas, que se encuentran en el territorio nacional, incluyendo las áreas naturales protegidas de administración nacional, las áreas de conservación regional y las áreas de conservación privada. Esta competencia abarca los recursos genéticos y sus derivados contenidos en todo o parte del ejemplar. Asimismo, en el artículo 13 del referido Reglamento se establece que es función de las Autoridades Nacionales Competentes admitir, evaluar, aprobar o denegar las solicitudes para el acceso a los recursos genéticos y sus derivados (literal b) y otorgar las autorizaciones o negociar y suscribir los contratos de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, en el ámbito de su competencia, asegurando la participación justa y equitativa en los beneficios (literal c);

Que, el citado Reglamento establece en su artículo 16 que, la eficacia de las autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales se encuentra sujeta a la suscripción de un contrato entre la solicitante y la Autoridad Nacional Competente. Así, en el marco de lo previsto por el RARG, mediante Resolución Ministerial N° 006-2022-MINAM se aprobó el “Formato de contrato para efectos de la eficacia de las autorizaciones de acceso sin fines comerciales”;

Que, el RARG, en su artículo 17 numeral 17.1 establece que, la autorización de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales es otorgada por las Autoridades Nacionales Competentes para todas aquellas actividades de investigación científica y/o desarrollo tecnológico de índole no comercial, que no comprendan la comercialización o industrialización de un producto o un proceso;

Que, el Texto Integrado del Reglamento de Organización y funciones del INIA, aprobado mediante Resolución Jefatural N° 006-2025-INIA, establece en su artículo 50 numeral 50.2 que, la Dirección de Gestión de la Innovación Agraria (DGIA), es el órgano de línea a través del cual el INIA ejerce la autoridad administrativa y de registro en las distintas materias bajo su competencia. Asimismo, el artículo 51 literal q) del referido instrumento de gestión estipula que, la DGIA tiene por función específica dirigir la implementación de las disposiciones técnicas de acceso a los recursos genéticos y sus derivados en el ámbito de su competencia y conforme a la normativa vigente en la materia;

Que, a través del artículo 6 literales b) y c) de la Resolución Jefatural N° 243-2024-INIA, la Jefatura del INIA delega en el Director General de la DGIA, la facultad de suscribir autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales, contratos y formatos que se requiera para su eficacia y aplicación; así como emitir el acto administrativo que corresponda, durante el Ejercicio Fiscal 2025;

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 015-2025-INIA-DGIA

- 3 -

Que, mediante solicitud s/n recepcionada con fecha 08 de mayo de 2025, la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** solicita el acceso a los recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi), sin fines comerciales, para la ejecución del proyecto titulado “Valorización de los alcaloides del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet): extracción, análisis por métodos espectroscópicos y espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-QTOF-MS) y evaluación in vitro de su potencial antihiperlipidémico, antioxidante, y antiobesidad en muestras comerciales peruanas”;

Que, mediante el Memorando N° 038-2025-MIDAGRI-INIA-DGIA/SDNIA, de fecha 23 de mayo de 2025, la Subdirección de Normatividad de la Innovación Agraria (SDNIA) admitió la solicitud referida en el párrafo anterior y, en cumplimiento de lo dispuesto en el artículo 30 del RARG, solicitó a la Unidad de Tecnología de la Información la publicación del extracto correspondiente en el portal institucional del INIA (www.gob.pe/inia), por un plazo de quince (15) días calendario, con fines de difusión;

Que, mediante el Informe N° 069-2025-MIDAGRI-INIA-DGIA-SDRIA/ARAPOV de fecha 25 de agosto de 2025 e Informe Técnico Legal N° 051-2025-MIDAGRI-INIA-DGIA/SDNIA-ARAPOV de fecha 26 de agosto de 2025, los especialistas técnico y legal en acceso a recursos genéticos de la Subdirección de Normatividad de la Innovación Agraria (SDNIA), respectivamente, evalúan que la solicitud ha cumplido con el procedimiento y requisitos estipulados en la normativa vigente, emitiendo opinión favorable a la solicitud y recomendando su aceptación;

Que, a partir de dicha evaluación técnica-legal esta Dirección General declaró **ACEPTADA** la solicitud de la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** a través de la Carta N° 065-2025-MIDAGRI-INIA-DGIA/D de fecha 27 de agosto de 2025, y, posteriormente mediante suscripción de documento denominado “ACTA REUNIÓN VIRTUAL DE NEGOCIACIÓN DE BENEFICIOS”, de fecha 18 de septiembre de 2025, se acordaron los detalles y forma de la entrega de los beneficios derivados del acceso y utilización de los recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi), sin fines comerciales, a otorgarse al INIA en representación del Estado Peruano;

Que, las autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales deberán contener como mínimo las disposiciones señaladas en el artículo 18 del RARG; las cuales han sido evaluadas mediante Informe Técnico Legal N° 061-2025-MIDAGRI-INIA-DGIA/SDRIA-ARAPOV, de fecha 13 de octubre de 2025; a fines de la motivación de la presente resolución administrativa;

Que, mediante Informe N° 720-2025-MIDAGRI-INIA-GG/OAJ de fecha 07 de noviembre de 2025, la Oficina de Asesoría Jurídica del INIA emite opinión favorable para continuar con el trámite para la suscripción del contrato de acceso;

Con el visto de la Subdirección de Normatividad de la Innovación Agraria;

De conformidad con las facultades conferidas en el Texto Integrado del Reglamento de Organización y Funciones del INIA, aprobado mediante Resolución Jefatural N° 006-2025-INIA; el Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM y la Resolución Jefatural N° 243-2024-INIA, a través de la cual se delega al Director General de la Dirección de Gestión de la Innovación Agraria, la facultad de suscribir autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales, contratos y formatos que se requiera para su eficacia y aplicación; así como emitir el acto administrativo que corresponda, durante el Ejercicio Fiscal 2025;

SE RESUELVE:

Artículo 1.- Otorgar a la UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA la autorización de acceso, sin fines comerciales, a los recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi), de origen peruano, cuya titularidad y soberanía es ejercida exclusivamente por el Estado peruano, con el objeto de su uso exclusivo para la ejecución del proyecto “*Valorización de los alcaloides del tarwi (Lupinus mutabilis Sweet): extracción, análisis por métodos espectroscópicos y espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-QTOF-MS) y evaluación in vitro de su potencial antihiperglicémico, antioxidante, y antiobesidad en muestras comerciales peruanas*” por las razones expuestas en los considerandos de la presente Resolución Directoral.

Artículo 2.- Suscribir el Contrato para el acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 014-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA con la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**, el cual tiene por objeto dotar de eficacia a la Autorización contenida en el artículo 1 de la presente Resolución Directoral, conforme a lo dispuesto en el artículo 16 del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM; el cual se ajusta en su integridad a la estructura desarrollada por el Ministerio del Ambiente en la Resolución Ministerial N° 006-2022-MINAM de fecha 10 de enero de 2022.

Artículo 3.- Establecer como prohibiciones para la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** las siguientes:

- a) No ceder o transferir a terceros el acceso, manejo o utilización de los recursos genéticos y sus derivados, sin contar con la autorización del INIA.
- b) No reclamar cualquier tipo de propiedad sobre los recursos genéticos y sus derivados.
- c) No utilizar los recursos genéticos y sus derivados para fines distintos a lo establecido en la presente Resolución Directoral.

Artículo 4.- Establecer como derechos de la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** en el marco de la presente Resolución Directoral:

- a) Acceder a los recursos genéticos y sus derivados para el cumplimiento de los objetivos presentados en el proyecto de investigación, en el marco de las condiciones y términos que se establecen para la autorización.
- b) Ser asistidos por el Instituto Nacional de Innovación Agraria, para el cumplimiento de sus obligaciones.

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 015-2025-INIA-DGIA

- 5 -

Artículo 5.- Establecer como obligaciones de **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** para el uso exclusivo señalado en el artículo 1 de la presente Resolución Directoral, las siguientes:

- a) No ceder o transferir a terceros los derechos y las obligaciones emanadas de la presente Autorización.
- b) No trasladar las muestras del recurso genético y sus derivados, fuera del país, salvo para los supuestos contemplados en el Plan de investigación, de corresponder.
- c) Presentar al **INIA** los informes anuales y/o extraordinarios, en idioma español, que le sean solicitados.
- d) Presentar obligatoriamente al **INIA** un (1) informe final sobre los resultados de la investigación y el cumplimiento de la totalidad de obligaciones asumidas en el marco de la presente Resolución, dentro del plazo máximo de sesenta (60) días hábiles siguientes a la culminación del proyecto de investigación, en idioma español. Dicho informe deberá incluir copia de un (01) ejemplar de todas las publicaciones generadas a partir de la ejecución del proyecto de investigación donde se deberá incluir el reconocimiento al origen peruano de los recursos genéticos y sus derivados accedidos; así como, los datos y/o información de estos y la mención del contrato de acceso correspondiente y de la presente Resolución Directoral.
- e) Incluir en los resultados y/o presentación de resultados, el reconocimiento al origen peruano de los recursos genéticos y sus derivados accedidos; así como, los datos y/o información de estos y, la mención del contrato de acceso correspondiente y de la presente Resolución Directoral.
- f) Otorgar los beneficios no monetarios determinados en el artículo 6 de la presente Resolución Directoral.
- g) Informar al **INIA** cualquier cambio o modificación a lo establecido en la autorización o contrato de acceso.
- h) Cumplir con la totalidad de las obligaciones asumidas en el Contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 014-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA; así como cumplir con la totalidad de las obligaciones asumidas en los contratos accesorios suscritos con los proveedores de los recursos biológicos, de corresponder.
- i) Cumplir con las obligaciones pendientes culminado el plazo de vigencia de la presente autorización, sin perjuicio de la facultad del INIA de exigirlos.
- j) Realizar el trámite para el traslado de muestras o colecta para el acceso autorizado, cuando corresponda.

- k) Destruir los remanentes de los recursos genéticos y sus derivados accedidos, resultado de la ejecución y/o culminación del proyecto de investigación con la finalidad de evitar el uso indebido de tales recursos, cuando se aplique el supuesto referido en la Cláusula Novena. Se deberá acreditar la referida destrucción con un informe documentado que incluya la prueba fehaciente de tal hecho.
- l) Si de la ejecución del proyecto se identifica un potencial uso comercial o industrial, la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** deberá solicitar al **INIA** la suscripción de un contrato de acceso con fines comerciales, en concordancia con el procedimiento establecido en el Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado con Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM.
- m) Brindar las facilidades al **INIA** de manera oportuna, para la efectiva supervisión, vigilancia y control e inspección del adecuado uso de los recursos genéticos y sus derivados accedidos.
- n) Hacer de conocimiento del **INIA** cualquier circunstancia, evento o hecho sobre los recursos genéticos y sus derivados accedidos, que represente una infracción al Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, a la Decisión 391 de la CAN y/o a las demás disposiciones legales vigentes sobre acceso a los recursos genéticos y sus derivados.
- o) Las demás obligaciones que establezcan las normas sobre la materia.

Artículo 6.- Determinar como beneficios no monetarios que otorgará la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** al **INIA**, en representación del Estado peruano, por el acceso a los recursos genéticos y sus derivados señalados en el artículo 1 de la presente Resolución Directoral, sin fines comerciales, aquellos establecidos en el artículo 49 numeral 49.1 y numeral 49.2 literal g) del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado mediante D.S. N° 019-2021-MINAM. La distribución justa y equitativa de dichos beneficios se realizará de conformidad a lo acordado en documento denominado "ACTA REUNIÓN VIRTUAL DE NEGOCIACIÓN DE BENEFICIOS", de fecha 18 de septiembre de 2025.

Artículo 7.- Establecer como vigencia de la autorización establecida en el artículo 1 de la presente Resolución Directoral, el plazo de treinta (30) meses. Este plazo se establece sin perjuicio de la facultad del **INIA** de exigir, por los medios que permite la Ley, el cumplimiento de las obligaciones vencidas.

Artículo 8.- Reconocer el derecho de la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA** de tramitar los eventuales derechos de propiedad intelectual que pudieran generarse a partir del proyecto de investigación que le correspondan. Dicha tramitación deberá ser comunicada al **INIA** dentro de los quince (15) días calendario de iniciado el procedimiento, bajo responsabilidad. Las condiciones específicas relativas a la distribución de beneficios derivados de los eventuales derechos de propiedad intelectual que se generen a partir de los proyectos de investigación para los que se autoriza el acceso a los recursos genéticos y sus derivados, se establecen en el contrato de acceso al que se hace referencia en el literal l) del artículo 5 de la presente Resolución de autorización.

Artículo 9.- Establecer que las modificaciones a las condiciones de la autorización que se otorga por el artículo 1 de la presente Resolución Directoral; así como la suspensión, cancelación, resolución y extinción se realizará de acuerdo a lo establecido en el Capítulo IV del Título IV del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM, en lo que corresponda. Las modificaciones a los términos y condiciones establecidas en la presente Autorización se realizan mediante Resolución, la cual debe ser publicada dentro de la vigencia de la presente Autorización.

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 015-2025-INIA-DGIA

- 7 -

Artículo 10.- Encargar a la Subdirección de Normatividad de la Innovación Agraria (SDNIA), la supervisión y control del cumplimiento del Contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 014-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA, el cual deberá incorporarse en el Registro de Acceso a los Recursos Genéticos a cargo de dicha Subdirección.

Artículo 11.- Disponer que la Unidad de Tecnología de la Información publique la presente Resolución Directoral junto con un extracto del Contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 014-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA, en el portal institucional de la entidad (www.gob.pe/inia).

Artículo 12.- Remitir una copia de la presente Resolución Directoral a la **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**, para su conocimiento y fines.

Regístrese, comuníquese y publíquese.



Firmado digitalmente por:
CALDAS CUEVA Jesus Francisco
FAU 20131365994 soft
Fecha: 04/12/2025 16:46:10

JESÚS FRANCISCO CALDAS CUEVA
Director General
Dirección de Gestión de la Innovación Agraria



V.B.
ALCANTARA DELGADO Jorge Enrique
FAU 20131365994 hard
Fecha: 04/12/2025 16:43:09



Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado por INIA, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la lectura del código QR o el siguiente enlace:
<https://std.inia.gob.pe/consulta/diFile.php?var=t8GFuYOAfiWzqL%2FAj2W3qH1iXCCr66Sw09hYGCnlJ2KYFOjg4C7eWJ3wKtgvX56cV20prnzXpHSvA%3D%3D>



FUNDACION PARA EL DESARROLLO AGRARIO

Jr. Camilo Carrillo N° 325 -Jesús María - Lima - Lima

Punto de emisión : Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Lima

RUC: 20101259014

FACTURA ELECTRÓNICA

F228 - 00000323

Fecha : 22/01/2024

Forma de pago : CONTADO

Señor(es): UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

RUC: 20141637941

Dirección: URB. SAN JOSE S/N UMACOLLO-AREQUIPA-AREQUIPA-AREQUIPA

Referencia:

Nro. O/C:

Nro. Cuotas: 0

DESCRIPCIÓN	UND.	CANTIDAD	PRECIO UNIT.	IMPORTE
Semilla de Tarwi Alta gracia	KGM	2.00	10.000000	20.00
Semilla de Tarwi Cholo fuerte	KGM	2.00	10.000000	20.00
Semilla de tarwi Yunguyo	KGM	2.00	10.000000	20.00
Semilla de tarwi Patron Grande	KGM	2.00	10.000000	20.00
Semilla de tarwi Andenes	KGM	5.00	12.000000	60.00

SON: CIENTO CUARENTA Y 00/100 SOLES

TOTAL GRAVADA	TOTAL EXONERADA	TOTAL DSCTO.	VALOR VENTA	IMPUESTO	ISC	IMPORTE TOTAL
S/ 0.00	S/ 140.00	S/ 0.00	S/ 140.00	S/ 0.00	S/ 0.00	S/ 140.00

Autorizado mediante resolución N° 0320050000973 /SUNAT

rA4hM2O2H9jb8iQzp9riBKR5pIg=

Puede descargar su comprobante desde el sitio: <http://consulta.fdaweb.com.pe>



Anexo 2. Resultado de la evaluación del efecto del desgrasado sobre el contenido de AQT del tarwi



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD
Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO N° ANA23D24.005263

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del cliente : Universidad Católica de Santa María
Dirección del cliente : Urb. San José S/N Umacollo
RUC : 20141637941
Identificación del contacto : Lena Gálvez
Descripción de la muestra : Harina de Tarwi 500 um

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Tamaño de muestra : 150 g
Fecha de recepción : 23/04/2024
Fecha de ejecución de ensayo : 23/04/2024 al 26/04/2024
Fecha de emisión de informe : 26/04/2024
Página : 1 de 1

I. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO:

ANÁLISIS	UNIDADES	RESULTADO		
		1 rep	2 rep	3 rep
DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE HUMEDAD Cereales y Menestras, NTP 205.002:1979 REVISADA 2011	%	6,89	6,83	7,01
DETERMINACIÓN DE GRASA Adaptado del Método gravimétrico NTP 209.263.2001	%	17,73	17,63	17,66

OBSERVACIONES:

- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


O.F. Ricardo A. Abril Ramírez
COFSA 00424
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



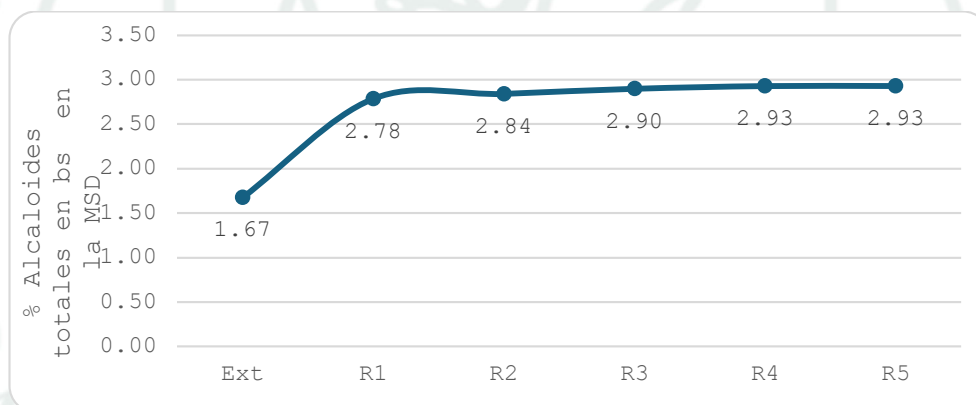
Anexo 3. Implementación del método de análisis de AQT por el método volumétrico y determinación del número de extracciones de las muestras de tarwi variedad tarwi andenes

Se analizó la metodología según en la NTE (8) para la determinación de alcaloides con el objetivo de determinar el número máximo de extracciones y se realizaron algunas modificaciones.

En la Figura A3-a, se muestran los resultados del % de para la muestra de tarwi sin desengrasar (entera); mientras que en la Figura A3-b se muestran los resultados del % de AQT para la muestra de tarwi desengrasada.

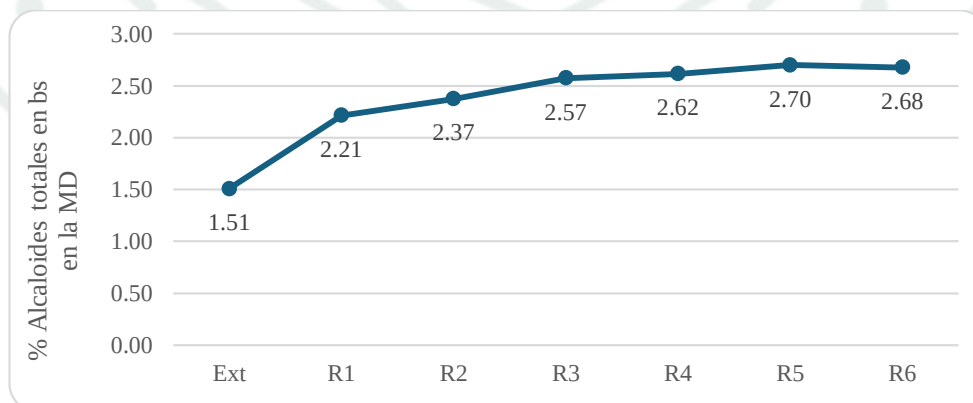
Figura A3-1. Concentración de alcaloides totales en base seca (%) para cada número de extracción en la MSD.

(a)



*Ext= extracción, R1-R5 = Reextracciones 1-5

(b)



*Ext= extracción, R1-R5 = Reextracciones 1-5

A partir de los resultados obtenidos se logró definir el número de extracciones necesarias que se realizarán para obtener la máxima concentración de alcaloides totales por el método volumétrico. Se concluye que se considerarán 5 extracciones (1 extracción y 4 reextracciones) para la muestra sin desgrasar y para la muestra desengrasada 6 extracciones (1 extracción y 5 reextracciones). Además, se debe tener precaución a la hora de realizar la valoración considerando que una gota (0.05 mL) de la solución valorante puede variar de forma significativa los resultados en este método analítico.



Anexo 4. Preparación de soluciones y reactivos para el análisis de AQT

Preparación de soluciones para el análisis de AQT

A) Solución de Hidróxido de Potasio 15% (P/V)

Se pesó 1.5 g de KOH y se disolvió con agua destilada en un beaker para luego ser llevado a una fiola de 10 mL, finalmente se trasvasó a un tubo falcon de 15 mL y se almacenó a temperatura ambiente.

B) Solución de Hidróxido de sodio 0.1 N – Solución madre

Se pesó 0.20 g de perlas de NaOH, se disolvió con agua destilada en un beaker y luego se llevó a una fiola con un volumen final de 500 mL, se homogenizó y finalmente se almacenó a temperatura ambiente.

C) Solución de Hidróxido de sodio 0.01 N – Solución valorante

Se midió 50 mL de la solución madre con una probeta y se trasvasó a una fiola de 500 mL, se homogenizó y se almacenó a temperatura ambiente.

D) Solución de Ácido Sulfúrico 0.1 N – Solución madre

Se midió 1.39 mL de una solución de H_2SO_4 al 96%, se llevó a una fiola con un volumen final de 500 mL y se almacenó a temperatura ambiente.

E) Solución Ácido Sulfúrico 0.01 N

Se midió 52.65 mL de la solución madre en una fiola con un volumen final de 500 mL finalmente fue almacenado a temperatura ambiente.

Estandarización de soluciones valorantes para el análisis de AQT

A) Estandarización de la solución de NaOH 0.01 N

Se pesó 0.02 g de biftalato de potasio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$), se disolvió en 100 mL de agua destilada, se agregó 3 gts de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.01 N. La solución incolora debe tornar a un color rosado o rojo grosella, indicando el punto final de la valoración. Los resultados se realizaron por triplicado y fueron obtenidos a partir de la Ecuación 3, Ecuación 4 y Ecuación 5 (61).

B) Estandarización de la solución de H_2SO_4 0.01 N

Se pesó 0.02 g de carbonato de sodio anhidro (CO_3Na_2) y se transfirió a un vaso de precipitado que contenía 100 mL de agua destilada, se homogenizó la muestra hasta la disolución completa y se agregó 3 gts del indicador anaranjado de metilo. La solución inicialmente presentó una coloración anaranjada muy tenue que posteriormente cambio a un color anaranjado oscuro. Los

resultados se realizaron por triplicado y fueron obtenidos a partir de la Ecuación 3, Ecuación 4 y Ecuación 5 (61).

$$V_t = \frac{\text{Peso del estándar primario (g)}}{\text{meq. Estándar primario} * N}$$

Ecuación 5. Determinación del volumen teórico

Donde:

V_t = Volumen teórico (mL)

N = Normalidad de NaOH (meq/mL)

meq estándar primario = 0.20422 g/meq

$$N = \frac{m * P}{P. eq * V_p}$$

Ecuación 6. Determinación de la verdadera concentración

Donde:

m = Peso del estándar primario (g)

P = Pureza del estándar primario (99.50 %)

P. eq = Peso equivalente del estándar primario (204.22 g/eq)

V_p = Volumen de NaOH 0.01N gastado (L)

$$\%F = \frac{V_t}{V_p} * 100$$

Ecuación 7. Determinación del factor de corrección

Donde:

%F = Factor de corrección

V_t = Volumen teórico del titulante (mL)

V_p = Volumen de NaOH 0.01N gastado (mL)

Estandarización de la solución de NaOH 0.01 N

Tabla A4-1. Resultados obtenidos de la concentración verdadera (N) de la solución de NaOH 0.01 N

Muestra	Peso del $C_8H_5KO_4$ (g)	Pureza del estándar primario	Peso eq del estándar primario patrón (g/eq)	Volumen de NaOH 0.01N gastado (L)	Concentración verdadera de NaOH 0.01 N
M1	0.02013	0.9950	204.22	0.01022	0.00960
M2	0.02018	0.9950	204.22	0.01028	0.00956
M3	0.02020	0.9950	204.22	0.01034	0.00952
				Promedio	0.00956
				DS	0.00004
				CV	0.412

Tabla A4-2. Resultados obtenidos del factor de corrección (%) de la solución de NaOH 0.01 N

Muestra	Volumen teórico NaOH (mL)	Volumen práctico NaOH (mL)	Factor de corrección	Factor de corrección (%)
M1	9.79	10.22	0.9583	95.83
M2	9.79	10.28	0.9528	95.28
M3	9.79	10.34	0.9472	94.72
			Promedio	94.999
			DS	0.391
			CV	0.412

Estandarización de la solución de H_2SO_4 0.01 N

Tabla A4-3. Resultados obtenidos de la concentración verdadera (N) de la solución de H_2SO_4 0.01 N

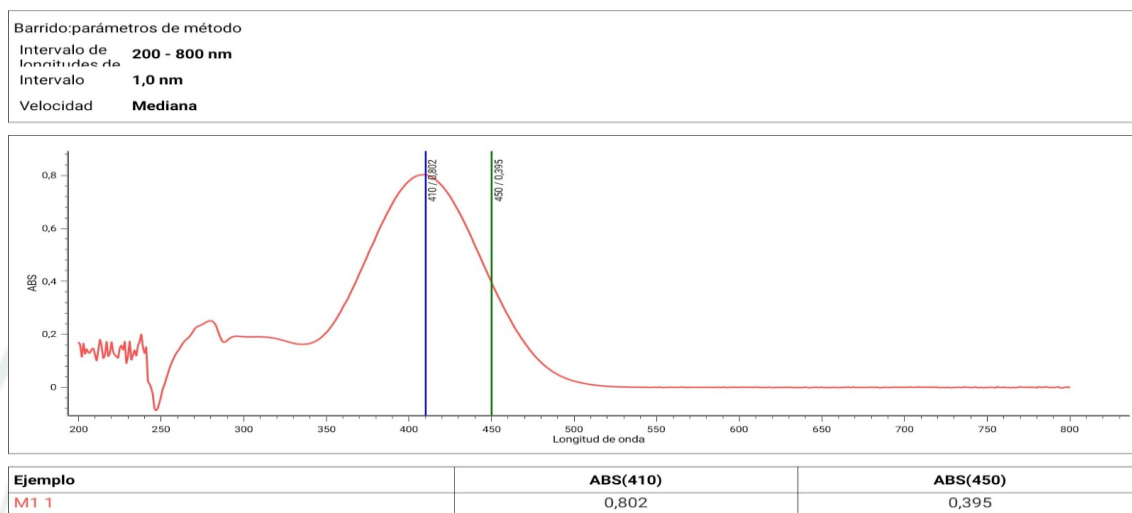
Muestra	Peso del Na_2CO_3 (g)	Pureza del estándar primario	Peso eq del estándar primario patrón (g/eq)	Volumen de H_2SO_4 0.01N gastado (L)	Concentración verdadera de H_2SO_4 0.01 N
M1	0.02010	0.9995	52.995	0.03868	0.009800
M2	0.02009	0.9995	52.995	0.03886	0.009750
M3	0.02014	0.9995	52.995	0.03874	0.009805
				Promedio	0.00979
				DS	0.00003
				CV	0.3108

Tabla A4-4. Resultados obtenidos del factor de corrección (%) de la solución de H_2SO_4 0.01 N

Muestra	Volumen teórico H_2SO_4 (mL)	Volumen práctico H_2SO_4 (mL)	Factor de corrección	Factor de corrección (%)
M1	37.74	38.68	0.9756	97.56
M2	37.74	38.86	0.9711	97.11
M3	37.74	38.74	0.9741	97.41
Promedio				97.258
DS				0.213
CV				0.219

Anexo 5. Barrido espectral para la determinación de la longitud de onda de análisis por el método espectrofotométrico

Figura A5-1. Espectro de absorción de la muestra de tarwi sin desgrasar de la variedad Andenes usando espectroscopia UV-Visible.



Anexo 6. Determinación de las condiciones de separación cromatográfica por UHPLC-DAD

Tabla A6-1. Análisis de las condiciones cromatográficas aplicadas en la columna C18.

Método	Fases móviles	Flujo (mL/min)	Longitud de onda de detección (nm)	Resultados				Observaciones	Referencias
				Estándar Lupanina de 500 ppm a 1000 ppm		Estándar Esparteína 500 ppm a 2500 ppm			
				Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)	Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)		
AQ-1	%C: ACN:CH ₂ O ₂ 0.1% %D: H ₂ O:CH ₂ O ₂ 0.1%	0.2	220 270 330	1.65	205.33	ND	ND	- El estándar de esparteína no fue detectado. - El estándar de lupanina fue detectado a 205 nm pero no muy definido.	(67,100,102)
AQ-2		0.2	200, 205, 215, 220, 270, 317 y 330	1.65	204.66	1.18	202.03; 305.35	- Pico de esparteína muy pequeño a 317 nm - Se probaron más longitudes de onda de detección para esparteína - Lupanina fue detectado a 205 nm pero el pico no fue muy definido, además el pico de esparteína y lupanina coeluyen.	

Método	Fases móviles	Flujo (mL/min)	Longitud de onda de detección (nm)	Resultados				Observaciones	Referencias
				Estándar Lupanina de 500 ppm a 1000 ppm		Estándar Esparteína 500 ppm a 2500 ppm			
				Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)	Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)		
AQ-3	%C: ACN:CH ₂ O ₂ 0.1% %D: H ₂ O:CH ₂ O ₂ 0.1%	0.2	200, 205, 210, 220, 270, 300, 305, 310, 315 y 330	1.56 a 1.71 (rango)	202.89; 203.5	1.17	196.12; 305.21	- El estándar de lupanina fue detectada a 205 nm pero el pico fue ancho - El estándar de esparteína fue mejor detectado a 305 nm	(67,100,102)
AQ-4	%C: ACN: CH ₂ O ₂ 0.1% %D: H ₂ O:CH ₂ O ₂ 0.1%	0.2	200, 205, 210, 220, 270, 300, 305, 310, 315 y 330	ND	ND	1.17	214; 304.99	- El estándar de lupanina no fue detectado. - El estándar de esparteína se observa un pico con mejor visualización	(103)
AQ-5	%C: ACN: CH ₂ O ₂ 0.1% %D: H ₂ O:CH ₂ O ₂ 0.1%	0.2	200, 205, 210, 220, 270, 300, 305, 310, 315 y 330	ND	ND	1.13 a 1.14 (rango)	199.95; 305.26	- El pico del estándar de lupanina no fue muy definido a 205 nm. - El estándar de esparteína fue detectado a 305 nm y su concentración fue aumentando correlativamente.	(102)

Método	Fases móviles	Flujo (mL/min)	Longitud de onda de detección (nm)	Resultados				Observaciones	Referencias
				Estándar Lupanina de 500 ppm a 1000 ppm		Estándar Esparteína 500 ppm a 2500 ppm			
				Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)	Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)		
AQ-6	%C: ACN: CH ₂ O ₂ 0.1% %D: H ₂ O:CH ₂ O ₂ 0.1%	0.2	200, 205, 210, 220, 270, 300, 305, 310, 315 y 330	ND	ND	1.06 a 1.08	192.47; 307.32	- El estándar de lupanina no fue detectado - El estándar de esparteína fue detectado a 305 nm pero no presentaba picos definidos.	(84)
AQ-7	%C: ACN 100% %D: Metanol 100% %D: H ₂ O:CH ₂ O ₂ 0.1%	0.15	200, 205, 210, 220, 270, 300, 305, 310, 315 y 330	1.47 a 1.49 (rango)	209.85	1.51	200.07; 233.33; 307.75	- El estándar de lupanina fue detectado a 205 nm - El estándar de esparteína a 305 nm presenta diferente espectro de absorción (picos partidos).	(67)

AQ-8	%C: H ₂ O 100% %D: ACN:CH ₂ O ₂ 0.05%	0.3	205, 305	0.788	202.78	0.78 a 2.42	231.89; 305.43	- El estándar de lupanina fue detectado a 205 nm con un pico definido - El estándar de esparteína fue detectado a 305 nm, pero se observaron picos partidos y separados debido a una posible protonación parcial.	(104)
AQ-9	%C: H ₂ O:CH ₂ O ₂ 0.05% %D: ACN:CH ₂ O ₂ 0.05%	0.3	205, 305	0.787	203.69	0.773	196.78; 304.93	- El estándar de lupanina fue detectado a 205 nm con un pico no definido (coelución con esparteína a 205 nm). - El estándar de esparteína fue detectado a 305 nm, con un pico bien definido.	(104)
AQ-10	%C: H ₂ O %D: ACN	0.3	205, y 305	0.787	203.78	4.43 y 6.07	195.52; 233.86; 306.36	- El estándar de lupanina fue detectado a 205 nm con un pico definido (sin coelución con esparteína a 205 nm). - El estándar de esparteína fue detectado a 305 nm, pero se observaron picos partidos y separados debido a una posible protonación parcial.	(104)

AQ-11	%C: H ₂ O:CH ₂ O ₂ 0.025% %D: ACN:CH ₂ O ₂ 0.05%	0.3	205, 305	0.782	203.39	0.78 y 1.57	197.08; 232.93; 304.77	- El estándar de lupanina fue detectado a 205 nm con un pico no definido (coelución con esparteína a 205 nm) - El estándar de esparteína fue detectado a 305 nm, pero se observaron picos muy separados debido a una posible protonación parcial.	(104)
--------------	--	-----	----------	-------	--------	-------------	------------------------------	--	-------

*ND: no detectado

**Gradientes de elución probados con la columna C18 y usados en los métodos
presentados en la Tabla A6-1**

Tabla A6-2. Gradiente de elución para método AQ-1, AQ-2 y AQ-3 (67,100,102)

Tiempo (min)	%C (ACN: CH₂O₂ 0.1%)	%D (H₂O: CH₂O₂ 0.1%)
0	5	95
5	5	95
10	5	95
15	95	5
20	5	95
25	5	95

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-3. Gradiente de elución para método AQ-4 (103)

Tiempo (min)	%C (ACN: CH₂O₂ 0.1%)	%D (H₂O: CH₂O₂ 0.1%)
0	0	100
10	0	100
11	80	20
12	95	5
20	0	100

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-4. Gradiente de elución para método AQ-5 (102)

Tiempo (min)	%C (ACN: CH₂O₂ 0.1%)	%D (H₂O: CH₂O₂ 0.1%)
0	5	95
1	5	95
16	95	5
18	95	5
25	5	95

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-5. Gradiente de elución para método AQ-6 (84)

Tiempo (min)	%C (ACN: CH₂O₂ 0.1%)	%D (H₂O: CH₂O₂ 0.1%)
0	5	95
0.5	5	95
5	100	0
6	100	0
10	5	95

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-6. Gradiente de elución para método AQ-7 (67)

Tiempo (min)	%B (ACN 100%)	%C (Metanol 100%)	%D (H₂O: CH₂O₂ 0.1%)
0	40	40	20
2	40	50	20
4	20	60	20
5	20	60	20
10	40	40	20

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-7. Gradiente de elución para método AQ-8 (104)

Tiempo (min)	%C (H₂O 100%)	%D (ACN: CH₂O₂ 0.05%)
0	98	2
1	98	2
3	75	25
5	35	65
8	0	100
9	0	100
10	98	2
15	98	2

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-8. Gradiente de **elución** para método AQ-9 (104)

Tiempo (min)	%C (ACN: CH₂O₂ 0.05%)	%D (H₂O: CH₂O₂ 0.05%)
0	2	98
1	2	98
3	25	75
5	65	35
8	100	0
9	100	0
10	2	98
15	2	98

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-9. Gradiente de **elución** para método AQ-10 (104)

Tiempo (min)	%A (H₂O 100%)	%B (ACN 100%)
0	98	2
1	98	2
3	75	25
5	35	65
8	0	100
9	0	100
10	98	2
15	98	2

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-10. Gradiente de **elución** para método AQ-11 (104)

Tiempo (min)	%A (H₂O:CH₂O₂ 0.025%)	%B (ACN:CH₂O₂ 0.05%)
0	98	2
1	98	2
3	75	25
5	35	65
8	0	100
9	0	100
10	98	2
15	98	2

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-11. Análisis de las condiciones cromatográficas probadas con la columna EVO C18.

Método	Fases móviles	Flujo (mL/min)	Longitud de onda de detección (nm)	Resultados				Observaciones	Referencias
				Estándar Lupanina 500 ppm		Estándar Esparteína 5000 ppm			
				Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)	Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)		
AQ-1	%C: H ₂ O 100% %D: ACN:CH ₂ O ₂ 0.05%	0.3	205 y 305	0.77	202.72	0.77 y 2.1	198.91; 232.69; 304.64	- El estándar de lupanina fue detectado a 205 nm con un pico bien definido. - El estándar de esparteína fue detectado a 305 nm, pero se observaron picos muy separados debido a una posible protonación parcial.	(104)
AQ-2	%C: H ₂ O: CH ₂ O ₂ 0.05% %D: ACN:CH ₂ O ₂ 0.05%	0.3	205 y 305	0.77	202.36	0.763	197.85 y 304.93	- El estándar de lupanina fue detectado a 205 nm con un pico no definido (coelución con esparteína a 205 nm). - El estándar de esparteína fue detectado a 305 nm, con un pico bien definido.	(104)

Método	Fases móviles	Flujo (mL/min)	Longitud de onda de detección (nm)	Resultados				Observaciones	Referencias
				Estándar Lupanina 500 ppm		Estándar Esparteína 5000 ppm			
				Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)	Tiempo de retención (min)	Espectro absorción (nm)		
AQ-3	%A: H ₂ O 100% %B: ACN CH ₂ O ₂ 0.1% %C: H ₂ O: CH ₂ O ₂ 0.15%	0.3	205 y 305	0.772	202.57	0.78, 1.02 y 4.69	196.05, 232.66 y 304.79	- Se observaron varios picos del estándar de esparteína debido a la poca acidificación en las fases móviles. - No se pudieron separar bien los compuestos	(104) modificado
AQ-4	%A: H ₂ O 100% %B: ACN 100% %C: H ₂ O: CH ₂ O ₂ 0.15%	0.3	205 y 305	0.77	202.74	0.77 y 1.013	197.77, 232.37 y 304.62	- Se observaron dos picos del estándar de esparteína debido a la poca acidificación en las fases móviles. - No se pudieron separar bien los compuestos	(104) modificado

Gradientes de elución utilizando la columna EVO C18

Tabla A6-12. Gradiente de elución para método AQ-1 (104)

Tiempo (min)	%C (H₂O 100%)	%D (ACN: CH₂O₂ 0.05%)
0	98	2
1	98	2
3	75	25
5	35	65
8	0	100
9	0	100
10	98	2
15	98	2

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-13. Gradiente de elución para método AQ-2 (104)

Tiempo (min)	%C (H₂O: CH₂O₂ 0.05%)	%D (ACN: CH₂O₂ 0.05%)
0	98	2
1	98	2
3	75	25
5	35	65
8	0	0
9	0	0
10	98	2
15	98	2

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-14. Gradiente de elución para método AQ-3

Tiempo (min)	%A (H₂O 100%)	%B (ACN: CH₂O₂ 0.1%)	%C (H₂O: CH₂O₂ 0.1%)
0	98	2	0
1.2	98	2	0
1.5	0	0	100
3	0	0	100
6	0	98	2
7	0	98	2
10	98	2	0
15	98	2	0

*ACN: Acetonitrilo

Tabla A6-15. Gradiente de elución para método AQ-4

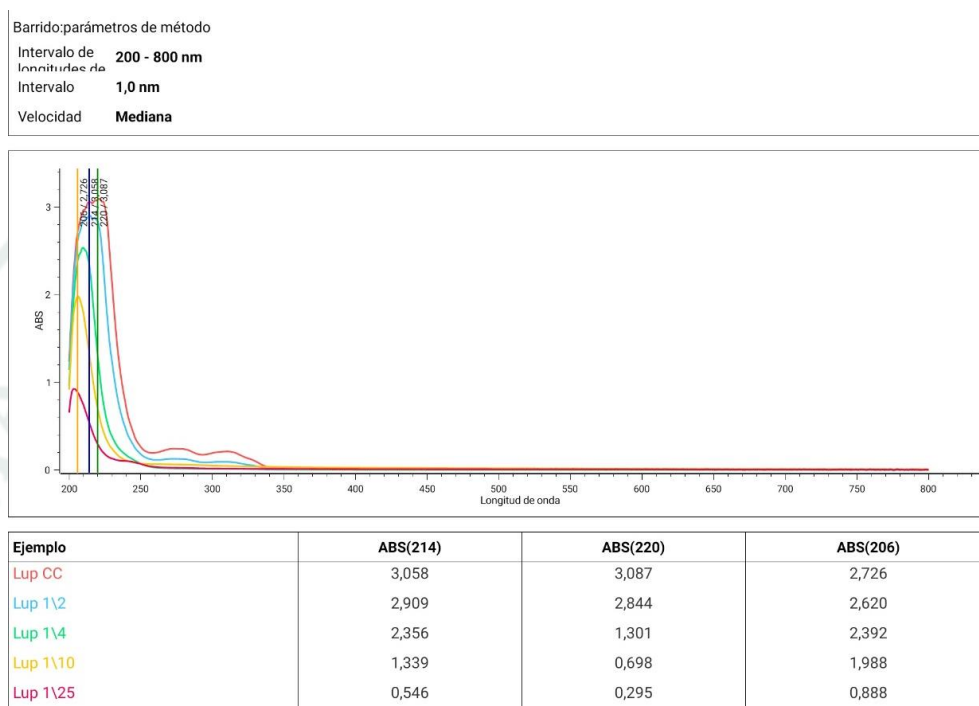
Tiempo (min)	%A (H₂O 100%)	%B (ACN 100%)	%C (H₂O: CH₂O₂ 0.1%)
0	98	2	0
1.2	98	2	0
1.5	0	0	100
3	0	0	100
6	0	98	2
7	0	98	2
10	98	2	0
15	98	2	0

*ACN: Acetonitrilo

Anexo 7. Identificación de las longitudes de máxima absorción de los estándares de lupanina y esparteína

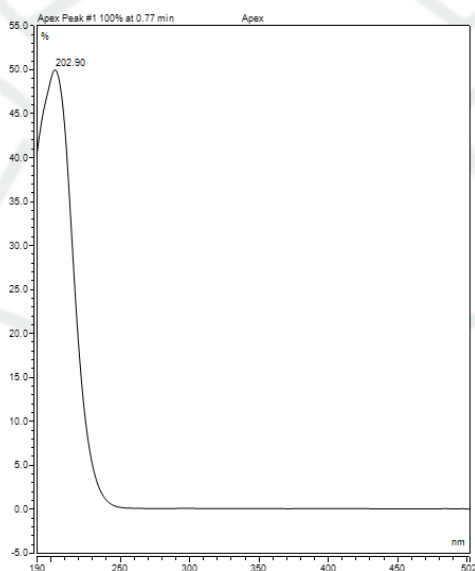
Barrido espectral del estándar de lupanina con espectrofotómetro UV-visible

Figura A7-1. Espectro de absorción del estándar de lupanina a diferentes concentraciones por el método espectrofotométrico.



* Lup cc = 1000 ppm, Lup1/2 = 500 ppm, Lup 1/4= 250 ppm, Lup 1/10= 100 ppm, Lup 1/25= 40 ppm.

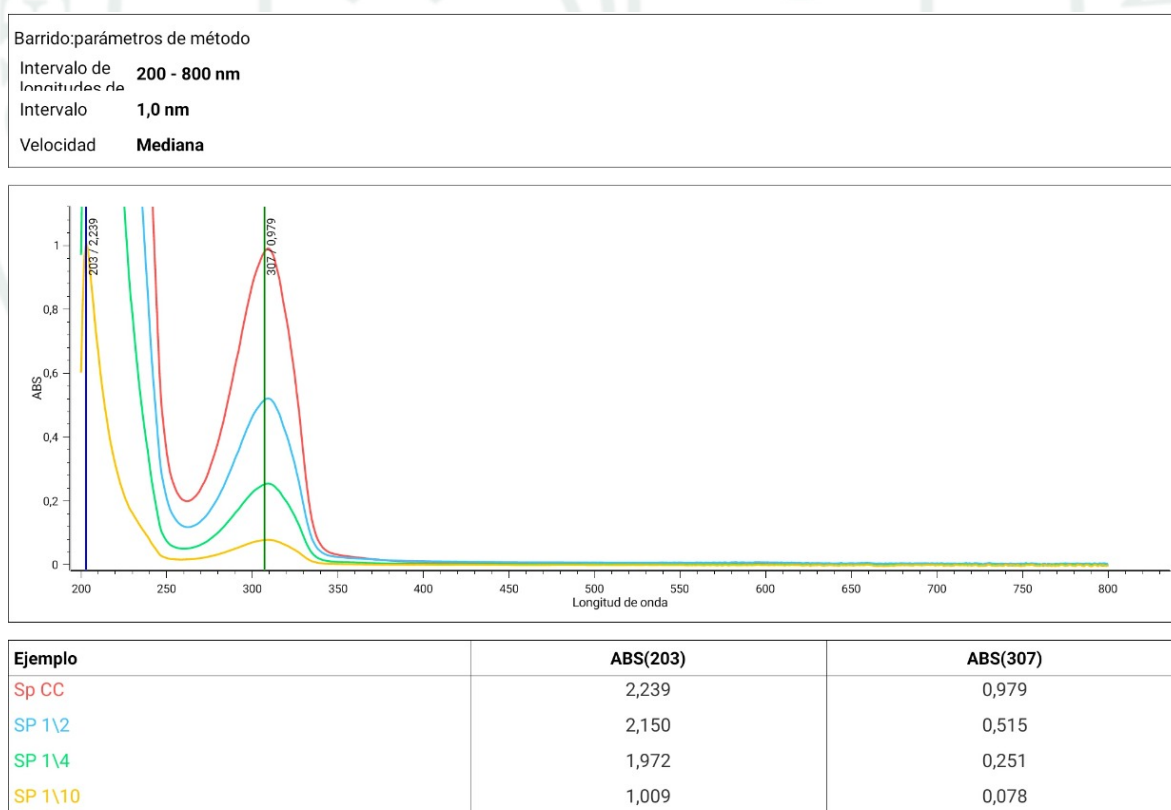
Figura A7-2. Espectro de absorción del estándar de lupanina a 500 ppm por UHPLC-DAD



En la Figura A7-1 se observó que la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción se presentó a 206 nm. valor que difiere ligeramente de las longitudes de onda reportadas en otros estudios, las cuales se sitúan en 214 nm y 220 nm (68,96). Estas variaciones pueden atribuirse a diferencias en la matriz analizada, el tipo de solvente utilizado, la concentración del analito y las condiciones experimentales empleadas. Por otro lado, en la Figura A7-2 se evidenció que, a una concentración de 500 ppm, la longitud de onda máxima de absorción se ubicó en 202.90 nm, valor que resultó muy cercano al determinado mediante el método espectrofotométrico (206 nm). Esta concordancia respalda la selección de la longitud de onda utilizada para la cuantificación y confirma la coherencia entre ambos enfoques analíticos. Asimismo, en los métodos cromatográficos evaluados (Anexo 06), se probaron también diferentes longitudes de onda de detección para lupanina (desde 200 a 330 nm), encontrándose que la mayor área del pico del compuesto se presentó a 205 nm.

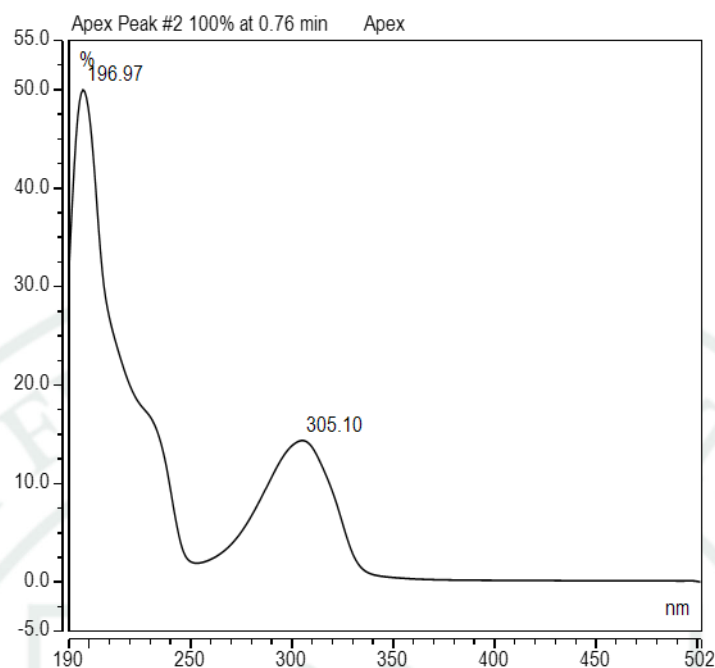
Barrido espectral del estándar de esparteína con espectrofotómetro UV-visible

Figura A7-3. Espectro de absorción del estándar de esparteína a diferentes concentraciones por el método espectrofotométrico.



* Esp cc= 5000 ppm, Esp 1/2= 2500 ppm, Esp 1/4= 1250 ppm y Esp 1/10= 500 ppm

Figura A7-4. Espectro de absorción del estándar de esparteína a 500 ppm por UHPLC-DAD



En la Figura A7-3 se identificaron dos bandas de absorción del estándar de esparteína: la banda II, ubicada alrededor de 203 nm, y la banda I, cercana a 307 nm. en el espectro de absorción obtenido por UHPLC-DAD y presentado en la Figura A7-4, también se observaron 2 bandas, una a 200 nm aproximadamente (banda II) y otra a 305 nm (banda I); sin embargo, la cuantificación se efectuó a 305 nm, debido a que en esta longitud de onda se observó un aumento progresivo del área con el aumento de la concentración del estándar. además, el pico de esparteína a una misma concentración presentó la mayor área a 305 nm, al probar longitudes de onda desde 200 nm hasta 330 nm (Anexo 04).

Anexo 8. Construcción de la curva de calibración aplicada para la optimización de parámetros de extracción usando la columna C18

1. Resultados

Tabla A8-1. Áreas obtenidas de las réplicas de los estándares de lupanina

Concentración (mg/mL)	Concentración (ppm)	Áreas bajo la curva (mUA*min)			
		R1	R2	R3	Promedio
0.0712	71.2000	18763.65	19277.01	19129.46	19056.71
0.1780	178.0001	44038.38	43464.2	43517.36	43673.31
0.3560	356.0002	88961.32	87080.69	86974.91	87672.31
0.5340	534.0003	135828.98	131715.76	135222.64	134255.79
0.7120	712.0005	166930.83	164349.27	164483.12	165254.41

Tabla A8-2. Áreas obtenidas de las réplicas de los estándares de esparteína

Concentración (mg/mL)	Concentración (ppm)	Áreas bajo la curva (mUA*min)			
		R1	R2	R3	Promedio
0.25	250	1138.54	1099.44	1144.26	1127.41
0.50	500	4540.54	4469.02	4616.73	4542.09
1.00	1000	8958.22	8894.44	8891.09	8914.58
1.50	1500	14114.07	13810.26	13978.59	13967.64
5.00	5000	47155.46	45716.68	46157.19	46343.11

A partir de los resultados obtenidos se preparó la curva de calibración tanto para el estándar de lupanina (Figura A8-1) como para el estándar de esparteína (Figura A8-2).

Figura A8-1. Curva de calibración del estándar del lupanina – columna C18 fase reversa

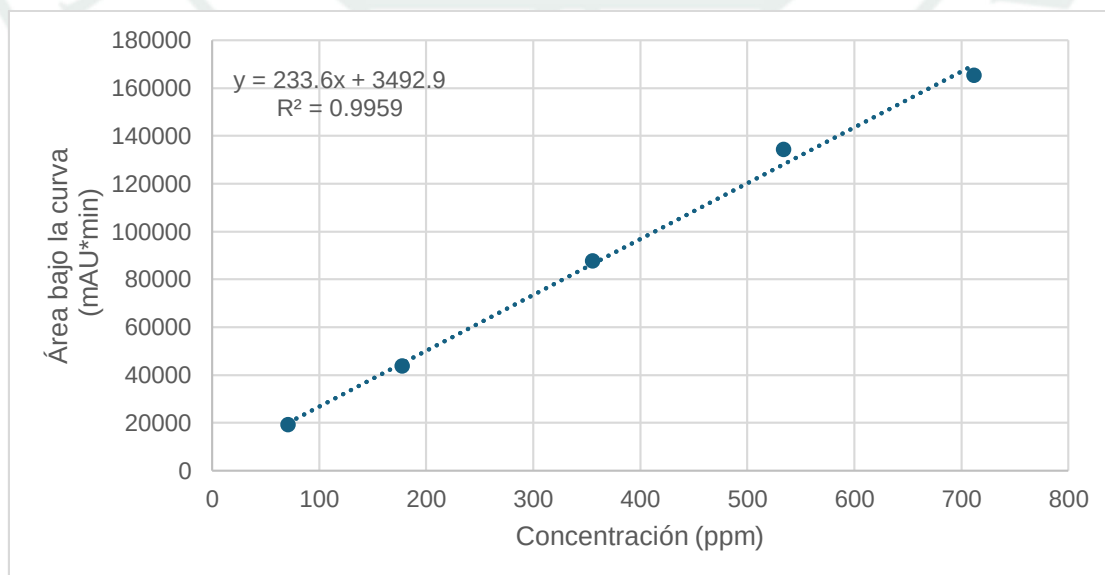
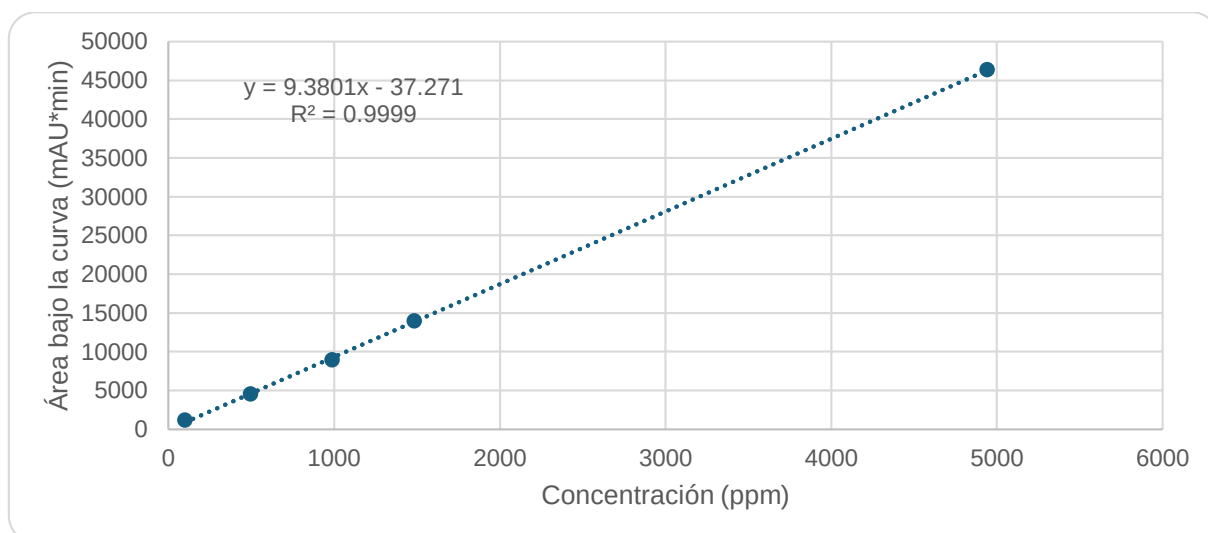


Figura A8-2. Curva de calibración del estándar de esparteína – columna C18 fase reversa



Las curvas de calibración permitieron realizar interpolaciones para poder calcular la concentración de lupanina y esparteína en las muestras analizadas.

**Anexo 9. Construcción de la curva de calibración aplicada para la determinación de AQ
de las variedades de tarwi usando la columna EVO C18**

1. Resultados

Tabla A9-1. Áreas obtenidas de las réplicas de los estándares de lupanina

Concentración (mg/mL)	Concentración (ppm)	Áreas bajo la curva (mUA*min)			
		R1	R2	R3	Promedio
0.0179	17.8989	12775.69	13393.500	13488.92	13219.37
0.0358	35.7978	21059.43	20444.13	21201.44	20901.67
0.1074	107.3934	57537.15	58062.74	57360.91	57653.60
0.1790	178.9890	82795.32	84879.81	84913.77	84196.30
0.3580	357.9780	154067.48	153283.82	154356.42	153902.57

Tabla A9-2: Áreas obtenidas de las réplicas de los estándares de esparteína

Concentración (mg/mL)	Concentración (ppm)	Áreas bajo la curva (mUA*min)			
		R1	R2	R3	Promedio
0.49370	493.70	5502.81	5625.49	5554.09	5560.80
0.98739	987.39	10023.41	10211.17	10212.18	10148.92
1.48109	1481.09	15574.19	15221.95	15415.20	15403.78
2.46849	2468.49	24375.66	25053.68	24408.55	24612.63
4.93697	4936.97	49661.29	49308.34	49471.70	49480.44

A partir de los resultados obtenidos se preparó la curva de calibración tanto para el estándar de lupanina (Figura A9-1) como para el estándar de esparteína (Figura A9-2).

Figura A9-1. Curva de calibración del estándar de lupanina – columna EVO C18 fase reversa

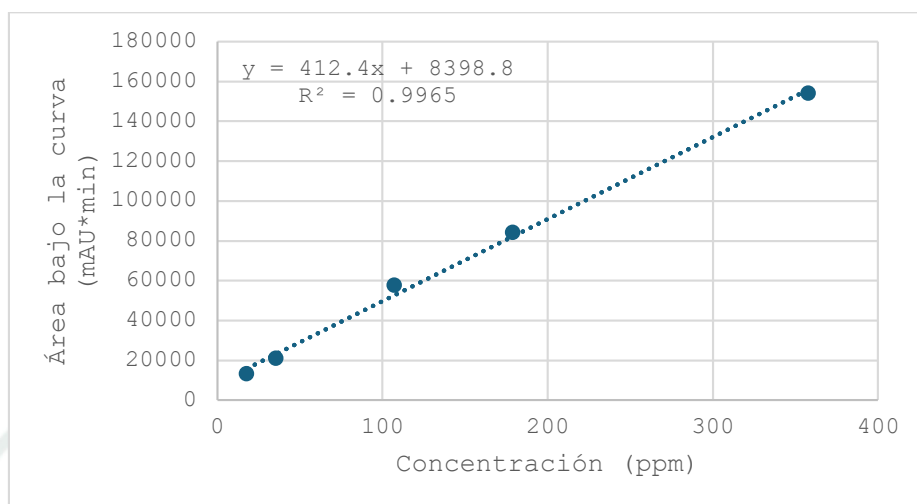
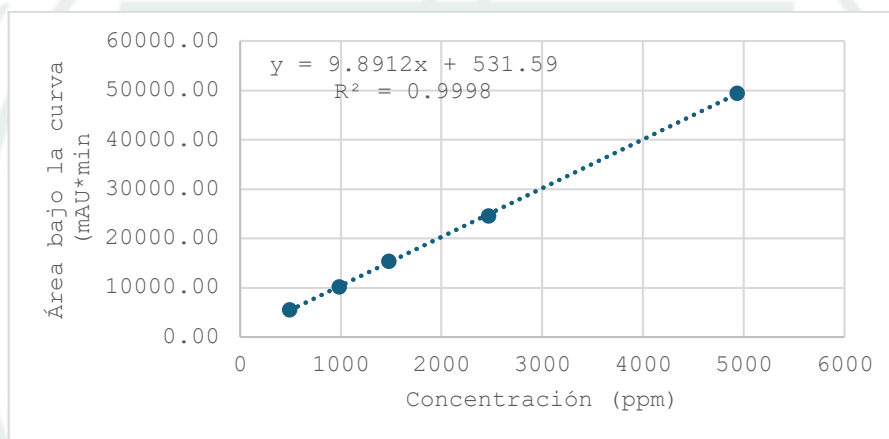


Figura A9-2. Curva de calibración del estándar de esparteína – columna EVO C18 fase reversa



Las curvas de calibración permitieron realizar interpolaciones para poder calcular la concentración de lupanina y esparteína en las muestras analizadas.

Anexo 10. Tablas estadísticas

Tabla A10-1. Análisis del color en la escala CIELab* de 5 variedades comerciales de tarwi

Parámetros	VARIEDADES				
	TY	TAG	TA	TPG	TCF
					
L*	71.55±0.41 ^{ab}	72.85±0.65 ^a	70.24±0.54 ^{bc}	70.27±0.30 ^{bc}	68.82±0.51 ^c
a*	2.74±0.06 ^a	2.12±0.17 ^d	2.26 ±0.06 ^{cd}	2.35±0.10 ^{bc}	2.53±0.08 ^b
b*	16.10±0.24 ^a	11.57±0.34 ^e	13.82±0.18 ^d	14.80±0.14 ^c	15.63±0.16 ^b
CI	2.38±0.03 ^{ab}	2.51±0.14 ^a	2.33±0.08 ^{ab}	2.26±0.11 ^b	2.35±0.09 ^{ab}

*N=5. Los valores que presentan la misma letra sobre las mismas filas no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Tabla A10-2 Características morfológicas y peso de 100 granos de semillas de 5 variedades de tarwi

Variedades	Parámetros			
	Peso 100 granos (g)	Largo* (mm)	Ancho* (mm)	Espesor* (mm)
TY	26.04±0.90 ^c	10.55±0.16 ^a	8.59±0.17 ^a	4.77±0.17 ^b
TAG	28.60±0.17 ^{ab}	10.26±0.05 ^{ab}	8.51±0.06 ^a	5.36±0.04 ^a
TA	27.14±1.61 ^{bc}	10.13±0.18 ^b	8.43±0.02 ^a	4.90±0.12 ^b
TPG	29.73±0.46 ^a	10.12±0.08 ^b	8.66±0.05 ^a	5.45±0.04 ^a
TCF	29.52±0.37 ^a	10.16±0.08 ^b	8.56±0.11 ^a	5.46±0.02 ^a

*N=25 semillas. Los valores que presentan la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla A10-3. Concentración (g lupanina/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales y residuales comparando métodos de extracción y cuantificación de la muestra de Tarwi Andenes

Tipo de muestra	Método Volumétrico		Método Espectrofotométrico		Método de Muzquiz adaptado	
	MSD	MD	MSD	MD	MSD	MD
AQT	3.06±0.05 ^d	2.49±0.02 ^f	3.28±0.04 ^c	2.68±0.07 ^e	3.94±0.02 ^a	3.72±0.05 ^b
AQR	0.34±0.05 ^a	0.17±0.02 ^b	0.06±0.002 ^d	0.10±0.002 ^{cd}	0.19±0.01 ^b	0.15±0.01 ^{bc}

*AQT (Alcaloide quinolizidínicos totales) AQR (Alcaloides quinolizidínicos residuales) MD (Muestra desgrasada) MSD (Muestra sin desengrasar). Los valores que presentan la misma letra en una fila no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla A10-4. Concentración (g lupanina/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales y residuales comparando métodos de extracción y cuantificación de la muestra de Tarwi Andenes

Tipo de muestra	Método Volumétrico	Método Espectrofotométrico	Método de Muzquiz adaptado
AQT	3.06±0.05 ^c	3.28±0.04 ^b	3.94±0.02 ^a
AQR	0.34±0.05 ^c	0.06±0.002 ^a	0.19±0.01 ^b

*AQT (Alcaloides quinolizidínicos totales) AQR (Alcaloides quinolizidínicos residuales). Los valores que presentan la misma letra en una fila no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

Tabla A10-5. Concentración de alcaloides quinolizidínicos (g de AQ/ 100 g bs según la proporción el P/V cuantificado UHPLC-DAD.

Proporción P/V	Alcaloides quinolizidínicos		
	AQT	Lupanina	Derivados de Esparteína
1/5	3.53±0.20 ^a	3.13±0.19 ^a	0.40±0.01 ^a
1/10	2.85±0.61 ^a	2.44±0.59 ^a	0.42±0.02 ^a

*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales). Los resultados son expresados como el promedio ± DS. Los valores que presentan la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey.

Tabla A10-6. Concentración (g de AQ/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales según el tipo de ácido cuantificado por UHPLC-DAD

Tipo de ácido	Lupanina	Derivados Esparteína	AQT
HCl 0.1N	2.90±0.22 ^{ab}	0.40±0.001 ^a	3.30±0.22 ^{ab}
HCl 0.5N	2.62±0.13 ^b	0.37±0.01 ^a	2.99±0.14 ^b
HCl 1.0 N	3.16±0.09 ^a	0.38±0.03 ^a	3.54±0.12 ^a
TCA 5%	3.02±0.17 ^{ab}	0.40±0.01 ^a	3.42±0.17 ^{ab}

*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales) Los resultados son expresados como el promedio ± DS. Los valores que presentan la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey o Dunn según corresponda.

Tabla A10-7. Concentración (g AQ/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por Ultraturrax cuantificado por UHPLC-DAD

Variables		Método de cuantificación por UHPLC-DAD		
Tiempo (seg.)	Velocidad (rpm)	Lupanina	Derivados de Esparteína	AQT
60	5000	1.38±0.06 ^b	0.41±0.02 ^a	1.79±0.06 ^b
	10000	1.70±0.35 ^{ab}	0.42±0.05 ^a	2.12±0.36 ^{ab}
	15000	2.04±0.30 ^{ab}	0.40±0.02 ^a	2.44±0.32 ^{ab}
	20000	2.28±0.18 ^a	0.40±0.02 ^a	2.68±0.19 ^a
30	5000	1.77±0.33 ^{ab}	0.42±0.03 ^a	2.19±0.30 ^{ab}
	10000	2.32±0.22 ^a	0.40±0.01 ^a	2.72±0.22 ^a
	15000	2.17±0.36 ^a	0.40±0.02 ^a	2.57±0.38 ^a
	20000	2.33±0.16 ^a	0.39±0.01 ^a	2.72±0.16 ^a

*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales) * Los resultados son expresados como el promedio ± DS. Los valores que presentan la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey.

Tabla A10-8. Concentración (g AQ/ 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por agitación orbital, cuantificado por UHPLC-DAD

Variables		Método de cuantificación por UHPLC-DAD		
Tiempo (min)	Velocidad (min)	Lupanina	Derivados de Esparteína	AQT
15	200	2.25±0.07 ^a	0.37±0.001 ^a	2.62±0.07 ^a
	100	2.05±0.20 ^b	0.37±0.02 ^a	2.42±0.19 ^b
30	200	2.32±0.07 ^a	0.41±0.02 ^a	2.73±0.09 ^a
	100	2.03±0.21 ^b	0.36±0.03 ^a	2.39±0.22 ^b
60	200	1.96±0.20 ^a	0.37±0.02 ^a	2.33±0.22 ^a
	100	1.94±0.11 ^b	0.38±0.005 ^a	2.32±0.11 ^b

*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales). Los resultados son expresados como el promedio ± DS. Los valores que presentan la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey.

Tabla A10-9. Concentración (g AQ / 100 g bs) de alcaloides quinolizidínicos totales obtenidos por baño de ultrasonido, cuantificado por UHPLC-DAD

Variable	Método de cuantificación por UHPLC-DAD		
Tiempo (min)	Lupanina	Derivados Esparteína	AQT
15	2.02±0.11 ^a	0.40±0.02 ^a	2.42±0.11 ^a
30	2.10±0.16 ^a	0.38±0.02 ^a	2.49±0.17 ^a
60	2.22±0.10 ^a	0.37±0.02 ^a	2.59±0.12 ^a

*AQT (alcaloides quinolizidínicos totales) AQ (Alcaloides quinolizidínicos). Los resultados son expresados como el promedio ± DS. Los valores que presentan la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey o Dunn según corresponda.

Tabla A10-10. Concentración de alcaloides quinolizidínicos totales en g/100 g bs de 5 variedades de tarwi comparando tres métodos de cuantificación.

Variedades	Método de cuantificación		
	Von Baer	Muzquiz Adaptado	Muzquiz UHPLC-DAD
TY	3.64±0.05 ^{a B}	3.81±0.02 ^{a A}	3.41±0.14 ^{a AB}
TAG	3.57±0.03 ^{ab B}	3.80±0.07 ^{a A}	3.28±0.17 ^{ab C}
TA	3.47±0.09 ^{b B}	3.72±0.02 ^{ab A}	3.19±0.05 ^{ab C}
TPG	3.35±0.03 ^{c B}	3.62±0.06 ^{b A}	3.10±0.06 ^{bc C}
TCF	3.12±0.04 ^{d B}	3.31±0.04 ^{c A}	2.89±0.03 ^{c C}

*TY (Tarwi Yunguyo) – TAG (Tarwi Alta Gracia) – TA (Tarwi Andenes) – TPG (Tarwi Paton Grande) – TCF (Tarwi Cholo Fuerte). Los resultados son expresados como el promedio ± DS. Los valores que presentan las mismas letras mayúsculas en una fila (Método) no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey. Los valores que presentan las mismas letras minúscula en una columna (Variedad) no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey o Dunn según corresponda.

Tabla A10-11. Concentración de alcaloides quinolizidínicos totales en g/100 g bs de 5 variedades de tarwi obtenidos por Agitación orbital comparando dos métodos de cuantificación.

Variedades	Método de cuantificación	
	Muzquiz Adaptado	Muzquiz UHPLC-DAD
TY	3.81±0.02 ^{a A}	3.41±0.14 ^{a B}
TAG	3.80±0.07 ^{a A}	3.28±0.17 ^{ab B}
TA	3.72±0.02 ^{ab A}	3.19±0.05 ^{ab B}
TPG	3.62±0.06 ^{b A}	3.10±0.06 ^{bc B}
TCF	3.31±0.04 ^{c A}	2.89±0.03 ^{c B}

*TY (Tarwi Yunguyo) – TAG (Tarwi Alta Gracia) – TA (Tarwi Andenes) – TPG (Tarwi Paton Grande) – TCF (Tarwi Cholo Fuerte). Los resultados son expresados como el promedio ± DS. Los valores que presentan las mismas letras mayúsculas en una fila (Método) no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey. Los valores que presentan las mismas letras minúscula en una columna (Variedad) no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey o Dunn según corresponda.

Tabla A10-12. Concentración de alcaloides quinolizidínicos en g/100 g bs de 5 variedades de tarwi por UHPLC-DAD.

Variedades	Lupanina	Derivados de Lupanina	Derivados de Esparteína	AQT
TY	2.79±0.17 ^a	0.34±0.04 ^a	0.28±0.004 ^c	3.41±0.14 ^a
TAG	2.48±0.18 ^{bc}	0.27±0.01 ^{bc}	0.54±0.03 ^a	3.28±0.17 ^{ab}
TA	2.50±0.06 ^b	0.30±0.004 ^{ab}	0.39±0.03 ^b	3.19±0.05 ^{ab}
TPG	2.43±0.03 ^{bc}	0.28±0.04 ^{abc}	0.39±0.02 ^b	3.10±0.06 ^{bc}
TCF	2.23±0.05 ^c	0.23±0.03 ^c	0.42±0.02 ^b	2.89±0.03 ^c

*AQT (Alcaloides quinolizidínicos totales). Los resultados son expresados como el promedio ± DS. Los valores que presentan la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$) por la prueba de Tukey.

**Anexo 11. Análisis estadísticos del análisis óptico de las cinco variedades de las semillas
de *Lupinus mutabilis* Sweet**

Anexo 11a. Parámetro de Luminosidad

• **ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Luminosidad	4	46.19	11.547	46.67	7.23E-10

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

• **HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TAG	a
TY	b
TPG	c
TA	c
TCF	d

Anexo 11b. Parámetro de color a*

• **ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Parámetro a*	4	1.1870	0.29676	28.15	5.78E-8

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

• **HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TY	a
TCF	b
TPG	bc
TA	cd
TAG	d

Anexo 11c. Parámetro de color b*

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Parámetro b*	4	64.47	16.117	316.1	<2E-16

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY

Variedades	Grupos
TY	a
TCF	b
TPG	c
TA	d
TAG	e

Anexo 11d. Parámetro de índice de color (CI)

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
CI	4	0.1626	0.04065	4.244	1.2E-2

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY

Variedades	Grupos
TAG	a
TY	ab
TCF	ab
TA	ab
TPG	b

Anexo 12. Análisis estadísticos de las características morfológicas de cinco variedades de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet

Anexo 12a. Peso de 100 semillas

- ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Peso de 100 semillas	4	30.051	7.513	9.958	1.63E-3

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TPG	a
TCF	a
TAG	ab
TA	bc
TY	c

Anexo 12b. Largo

- ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Largo	4	0.3939	0.09847	6.85	6.37E-3

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TY	a
TAG	ab
TCF	b
TA	b
TPG	b

Anexo 12c. Ancho

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Ancho	4	0.09208	0.023020	2.533	0.106

*No existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

Anexo 12d. Espesor

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Espesor	4	1.2893	0.3223	33.5	9.13E-6

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY

Variedades	Grupos
TCF	a
TPG	a
TAG	a
TA	b
TY	b

**Anexo 13. Análisis estadísticos según los métodos de cuantificación y tipo de muestra
(MSD y MD)**

Anexo 13a. Alcaloides quinolizidínicos totales

• **ANOVA TWO WAY**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Pr(>F)
Método	3.7353	2	829.34	1.373E-13
Tipo de muestra	0.9612	1	426.84	9.543E-11
Interacción	0.1299	2	28.84	2.609E-05

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

• **HSD TUKEY: Interacción (Método y tipo de muestra)**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado.MSD	a
Muzquiz adaptado.MD	b
Espectrofométrico.MSD	c
Volumétrico.MSD	d
Espectrofotométrico.MD	e
Volumétrico.MD	f

Anexo 13b. Alcaloides quinolizidínicos residuales – Análisis no paramétrico

• **MÉTODO SCHEIRER-RAY-HARE (SRH)**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	H	Pr(>F)
Método	2	364.33	12.7836	1.68E-3
Tipo de muestra	1	29.39	1.0312	3.09E-1
Interacción	2	69.44	2.4366	2.96E-1

*Existe diferencia significativa con respecto al método de cuantificación ($p < 0.05$)

- DUNN TEST: Método**

Tratamiento	Grupos
Volumétrico.MSD	a
Muzquiz adaptado.MSD	b
Volumétrico.MD	b
Muzquiz adaptado.MD	bc
Espectrofotométrico.MD	cd
Espectrofotométrico.MSD	d

Anexo 13c. Alcaloides quinolizidínicos totales

- ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	2	1.2559	0.6280	335.1	6.99E-7

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY: Interacción (Método y tipo de muestra)**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	a
Espectrofotométrico	b
Volumétrico	c

Anexo 13d. Alcaloides quinolizidínicos residuales

- ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	2	0.11761	0.05881	70.39	6.83E-5

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- **HSD TUKEY: Interacción (Método y tipo de muestra)**

Tratamiento	Grupos
Espectrofométrico	a
Muzquiz adaptado	b
Volumétrico	c



Anexo 14. Análisis estadísticos de las proporciones p/v evaluadas por UHPLC-DAD

Anexo 14a. Lupanina

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Lupanina	1	0.7312	0.7312	3.871	0.121

*No existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p>0.05$)

Anexo 14b. Derivados de esparteína

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Derivados de esparteína	1	0.0005835	0.0005835	1.451	0.295

*No existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p>0.05$)

Anexo 14c. Alcaloides quinolizidínicos totales

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
AQT	1	0.6904	0.6904	3.359	0.141

*No existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p>0.05$)

Anexo 15. Análisis estadísticos del tipo de ácido evaluado por UHPLC-DAD

Anexo 15a. Alcaloides quinolizidínicos totales

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
AQT	3	0.5116	0.17055	6.057	1.87E-2

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY

Variedades	Grupos
HCl 1N	a
TCA 5%	ab
HCl 0.1N	ab
HCl 0.5 N	b

Anexo 15b. Lupanina

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Lupanina	3	0.4780	0.15932	6.14	1.80E-2

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY

Variedades	Grupos
HCl 1N	a
TCA 5%	ab
HCl 0.1N	ab
HCl 0.5 N	b

Anexo 15c. Derivados de esparteína – Análisis no paramétrico

- **KRUSKAL-WALLIS**

Tratamiento	χ^2	Suma de cuadrados	Pr(>F)
Derivados de esparteína	4.8462	3	0.1834

*No existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p>0.05$)



Anexo 16. Análisis estadísticos para la homogenización por ultraturrax

Anexo 16a. Alcaloides quinolizidínicos totales

- ANOVA TWO WAY**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Pr(>F)
Tiempo	0.51618	1	7.1840	1.642E-2
Velocidad	1.60375	3	7.4401	2.444E-3
Interacción	0.28590	3	1.3264	3.001E-1

*Existe diferencia significativa en los tratamientos evaluados ($p > 0.05$)

- HSD TUKEY: Interacción: Tiempo y velocidad**

Tratamiento	Grupos
30 seg + 20000 rpm	a
30 seg + 10000 rpm	a
60 seg + 20000 rpm	a
30 seg + 15000 rpm	a
60 seg + 15000 rpm	ab
30 seg + 5000 rpm	ab
60 seg + 10000 rpm	ab
60 seg + 5000 rpm	b

Anexo 16b. Lupanina

- ANOVA TWO WAY**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Pr(>F)
Tiempo	0.53388	1	7.5363	1.4374E-2
Velocidad	1.69441	3	7.9729	1.783E-3
Interacción	0.30187	3	1.4204	2.735E-1

*Existe diferencia significativa en el tratamiento de la velocidad ($p < 0.05$)

HSD TUKEY: Interacción: Tiempo y velocidad

Tratamiento	Grupos
30 seg + 20000 rpm	a
30 seg + 10000 rpm	a
60 seg + 20000 rpm	a
30 seg + 15000 rpm	a
60 seg + 15000 rpm	ab
30 seg + 5000 rpm	ab
60 seg + 10000 rpm	ab
60 seg + 5000 rpm	b

Anexo 16c. Derivados de esparteína

- ANOVA TWO WAY

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Pr(>F)
Tiempo	0.0001491	1	0.2073	0.6550
Velocidad	0.0014088	3	0.6531	0.5926
Interacción	0.0007499	3	0.3476	0.7914

*No existe diferencia significativa en los tratamientos ($p>0.05$)

Anexo 17. Análisis estadísticos para la homogenización por agitador orbital

Anexo 17a. Alcaloides quinolizidínicos totales

- ANOVA TWO WAY

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Pr(>F)
Tiempo	0.18821	2	3.5656	6.090E-2
Velocidad	0.14961	1	5.6687	3.471E-2
Interacción	0.08309	2	1.5741	2.471E-1

*Existe diferencia significativa en el tratamiento de la velocidad ($p > 0.05$)

- HSD TUKEY: Velocidad

Tratamiento	Grupos
200 rpm	a
100 rpm	b

Anexo 17b. Lupanina

- ANOVA TWO WAY

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Pr(>F)
Tiempo	0.17529	2	3.6712	5.702E-2
Velocidad	0.130592	1	5.4727	3.743E-2
Interacción	0.056769	2	1.1895	3.3785E-1

*Existe diferencia significativa en el tratamiento de la velocidad ($p > 0.05$)

- HSD TUKEY: Velocidad**

Tratamiento	Grupos
200 rpm	a
100 rpm	b

Anexo 17c. Derivados de esparteína

- ANOVA TWO WAY**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Pr(>F)
Tiempo	0.0006981	2	1.1138	3.6001E-1
Velocidad	0.0006460	1	2.0613	1.7663E-1
Interacción	0.0031172	2	4.9733	2.672E-2

*Existe diferencia significativa entre la interacción ($p > 0.05$)

- HSD TUKEY: Tiempo y Velocidad**

Tratamiento	Grupos
30 min + 200 rpm	a
60 min + 100rpm	a
15 min + 100 rpm	a
15 min + 200 rpm	a
60 min + 200 rpm	a
30 min + 100 rpm	a
30 min + 200 rpm	a

Anexo 18. Análisis estadísticos para la homogenización por baño ultrasónico

Anexo 18a. Alcaloides quinolizidínicos totales- Análisis no paramétrico

- KRUSKAL-WALLIS**

TRATAMIENTO	χ^2	Suma de cuadrados	Pr(>F)
Tiempo	1.8667	2	0.3932

*No existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p>0.05$)

Anexo 18b. Lupanina- Análisis no paramétrico

- KRUSKAL-WALLIS**

TRATAMIENTO	χ^2	Suma de cuadrados	Pr(>F)
Tiempo	3.2	2	0.2019

*No existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p>0.05$)

Anexo 18c. Derivados de esparteína

- ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Tiempo	2	0.001353	0.0006766	1.938	0.224

*No existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p<0.05$)

Anexo 19. Análisis estadísticos para la evaluación del método según las variedades analizadas

Anexo 19a. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TAG - Análisis no paramétrico

• **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	2	0.5428	0.27139	22.89	2.950E-4

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

• **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
Von Baer	B
Muzquiz UHPLC-DAD	C

Anexo 19b. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TY Análisis no paramétrico

• **KRUSKAL-WALLIS**

TRATAMIENTO	χ^2	Suma de cuadrados	Pr(>F)
Método	9.8462	2	7.277E-3

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

• **DUNN TEST**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
Von Baer	B
Muzquiz UHPLC-DAD	AB

Anexo 19c. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TA

• **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	2	0.5497	0.27484	77.14	2.170E-6

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
Von Baer	B
Muzquiz UHPLC-DAD	C

Anexo 19d. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TPG

- **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	2	0.5424	0.27118	102.6	6.390E-7

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
Von Baer	B
UHPLC-DAD	C

Anexo 19e. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TCF

- ANOVA

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	2	0.3599	0.17995	134.5	1.980E-7

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
Von Baer	B
Muzquiz UHPLC-DAD	C

**Anexo 20. Análisis estadísticos para la evaluación de las variedades según el método
analizado**

Anexo 20a. Alcaloides quinolizidínicos totales analizados por UHPLC-DAD

• **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Variedad	4	0.6267	0.15666	13.94	6.120E-5

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

• **HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TY	a
TAG	ab
TA	ab
TPG	bc
TCF	c

Anexo 20b. Alcaloides quinolizidínicos totales analizados por el método según Muzquiz adaptado

• **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Variedad	4	0.6794	0.16984	78.8	6.94E-10

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TY	a
TAG	a
TA	ab
TPG	b
TCF	c

Anexo 20c. Alcaloides quinolizidínicos totales analizados por el método según Von Baer

- ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Variedad	4	0.6585	0.1646	60.88	4.30E-9

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TY	a
TAG	ab
TA	b
TPG	c
TCF	d

Anexo 21. Análisis estadísticos para la evaluación del método según las variedades analizadas

Anexo 21a. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TAG - Análisis no paramétrico

• **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	1	0.5406	0.5406	31.18	1.40E-3

*Existe diferencia significativa entre los grupos de datos ($p < 0.05$)

• **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
Muzquiz UHPLC-DAD	B

Anexo 21b. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TY Análisis no paramétrico

• **KRUSKAL-WALLIS**

TRATAMIENTO	χ^2	Suma de cuadrados	Pr(>F)
Método	5.3333	1	2.092E-2

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

• **DUNN TEST**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz UHPLC-DAD	B
Muzquiz adaptado	A

Anexo 21c. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TA

• **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	1	0.5492	0.5492	369	1.29E-6

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
Muzquiz UHPLC-DAD	B

Anexo 21d. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TPG

- **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	1	0.5419	0.5419	150.6	1.79E-5

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
UHPLC-DAD	B

Anexo 21e. Alcaloides quinolizidínicos totales para la variedad TCF

- **ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Método	1	0.3584	0.3584	321.3	1.94E-6

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
Muzquiz adaptado	A
Muzquiz UHPLC-DAD	B

**Anexo 22. Análisis estadísticos para la evaluación de las variedades según el método
analizado**

Anexo 22a. Alcaloides quinolizidínicos totales analizados por UHPLC-DAD

- ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Variedad	4	0.6267	0.15666	13.94	6.120E-5

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TY	a
TAG	ab
TA	ab
TPG	bc
TCF	c

Anexo 22b. Alcaloides quinolizidínicos totales analizados por el método según Muzquiz adaptado

- ANOVA**

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Variedad	4	0.6794	0.16984	78.8	6.94E-10

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY**

Variedades	Grupos
TY	a
TAG	a
TA	ab
TPG	b
TCF	c

Anexo 23. Análisis estadísticos para la evaluación de las variedades por UHPLC-DAD

Anexo 23a. Alcaloides quinolizidínicos totales

- ANOVA

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Variedad	4	0.6267	0.15666	13.94	6.12E-5

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY

Tratamiento	Grupos
TY	a
TAG	ab
TA	ab
TPG	bc
TCF	c

Anexo 23b. Lupanina

- ANOVA

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
Variedad	4	0.6476	0.16189	12.15	1.33E-4

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY

Tratamiento	Grupos
TY	a
TA	b
TAG	bc
TPG	bc
TCF	c

Anexo 23c. Derivados de lupanina

- ANOVA

TRATAMIENTO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media	F	Pr(>F)
-------------	--------------------	-------------------	-------	---	--------

Variedad	4	0.02426	0.006065	7.59	1.50E-3
----------	---	---------	----------	------	----------------

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
TY	a
TA	ab
TPG	abc
TAG	bc
TCF	c

Anexo 23d. Derivados de esparteína

- KRUSKAL-WALLIS**

TRATAMIENTO	Df	χ^2	Pr(>F)
Variedad	4	15.329	4.066E-3

*Existe diferencia significativa en el tratamiento evaluado ($p < 0.05$)

- DUNN TEST**

Tratamiento	Grupos
TAG	a
TCF	b
TPG	b
TA	b
TY	c