



Universidad Católica de Santa María

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

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Evaluación *in vitro* de las propiedades antioxidantes, antihiperglicémicas y
antiobesidad de las fracciones hidrofílica, lipofílica y alcaloide de
variedades comerciales de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)**

Tesis presentada por:

Cana Gutierrez, Michael Junior

ORCID: 0009-0008-0912-652X

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Asesora:

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: 016076-C-EPFyB-2026

Visto el borrador del expediente 016076, presentado por:

2017152071 - CANA GUTIERREZ MICHAELL JUNIOR

Titulado:

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIHIPERGLICÉMICAS Y
ANTIOBESIDAD DE LAS FRACCIONES HIDROFÍLICA, LIPOFÍLICA Y ALCALOIDE DE
VARIEDADES COMERCIALES DE TARWI (LUPINUS MUTABILIS SWEET)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

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

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**29262816 - LOPEZ VALENCIA YENNY CANDELARIA
DICTAMINADOR**



**40617097 - NIETO MONTESINOS RITA MILAGROS
DICTAMINADOR**



**45767861 - CHOQUENAIRA QUISPE CELIA
DICTAMINADOR**



EVALUACIÓN IN VITRO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIHIPERGLICÉMICAS Y ANTIPOBESIDAD DE LAS FRACCIONES HIDROFÍLICA, LIPOFÍLICA Y ALCALOIDE DE VARIEDADES COMERCIALES DE TARWI (LUPINUS MUTABILIS SWE

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%	15%	4%	11%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	8%
2	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%

Excluir citas Apagado Excluir coincidencias < 1%
Excluir bibliografía Apagado

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fortaleza en este proceso.

A mi padre Ricardo Cana Caceres, a quien más admiro en esta vida. Gracias por creer en mí, por tus consejos, tu amor incondicional. Esto es por ti papito, te amo, gracias por ser mi fortaleza.

A mis tres angelitos que me cuidan desde el cielo: mis abuelitas, Felipa y Santisa, por su infinito cariño; y a mi hijita perruna, Maella, quien me acompañaba en cada trasnoche



AGRADECIMIENTOS

A mis Padres Ricardo y Ana María por el apoyo incondicional en mis años de vida.

A mis hermanos, por brindarme ánimo en cada etapa de mi vida; en especial a mi hermano Richard, por acompañarme y engreírme siempre.

A Luisa por cuidarme y atenderme en toda esta etapa

A mi asesora la Dra. Lena Gálvez Ranilla, por extenderme la mano y permitirme ser parte de su grupo de investigación, así como por su confianza y sus valiosos consejos en el ámbito profesional y personal.

A mis compañeros del Laboratorio de Ciencias de los Alimentos, por hacer esta etapa una experiencia muy amena y por el compañerismo y buenos consejos brindados.

A mis amigos Kevin, Alessandro, Emilia y Fabio por su tiempo y apoyo brindado en este proceso de investigación

Tania León, gracias por tu apoyo y ánimos en esta etapa.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante, el potencial antihiper glucémico y antiobesidad de las fracciones hidrofílicas (FH), lipofílicas (FL) y alcaloide (FA) de cinco variedades de tarwi peruano Andenes-TA, Cholo fuerte- TCF, Yunguyo-TY, Paton Grande-TPG y Alta Gracia-TAG. La capacidad antioxidante fue determinada con los métodos de inhibición de los radicales libres DPPH[•] y ABTS^{•+}, mientras que el potencial antihiper glucémico y antiobesidad fue evaluado a través de la capacidad inhibitoria *in vitro* sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y lipasa pancreática, respectivamente. La FH de las cinco variedades de tarwi presentó una mayor capacidad antioxidante (90 a 178 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g bs}$, método del DPPH[•]) que la FL (55 a 73 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g bs}$, método del DPPH[•]). Las respuestas fueron mayores con el método del ABTS^{•+} donde la FH mostró valores superiores (12608 a 15282 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g bs}$) que la FL (445 a 663 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g bs}$) y la FA (9629 a 11919 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g bs}$). La FH de las variedades de tarwi evaluadas mostró una mayor inhibición de la enzima α -glucosidasa (30,4 a 44,9 por ciento a 10 mg dosis de la muestra), mientras que la FA se destacó por presentar una alta inhibición de la enzima α -amilasa (52,5 a 77,9 por ciento a 50 mg de la dosis muestra). La FL tuvo una menor inhibición de la α -glucosidasa (3,7 a 9,4 por ciento a 10 mg dosis de la muestra) y no inhibió la α -amilasa. Las variedades TAG y TA presentaron la mayor capacidad antioxidante evaluada mediante el método ABTS^{•+}, mientras que las variedades TY y TCF destacaron por su potencial antihiper glucémico, evidenciado por su capacidad inhibitoria *in vitro* sobre la α -glucosidasa. La FA de la variedad TCF destacó por su mayor capacidad inhibitoria *in vitro* sobre la α -amilasa. No fue posible determinar el potencial antiobesidad del tarwi debido a interferencias de los metabolitos presentes en las fracciones del tarwi con el método fluorimétrico utilizado para medir la inhibición de la lipasa. Esto fue confirmado al analizar compuestos puros presentes en la FA como la esparteína y lupanina, compuestos que no mostraron dosis dependencia para esta propiedad.

Estos resultados aportan evidencia científica *in vitro* que contribuye a la revalorización del tarwi como un alimento útil para la prevención de enfermedades metabólicas. Asimismo, los hallazgos obtenidos constituyen una base bioquímica para la realización de futuros estudios *in vivo* orientados a validar las actividades biológicas observadas *in vitro*.

Palabra clave: *Lupinus mutabilis* Sweet, fracciones, enfermedades metabólicas.



ABSTRACT

The present study aimed at evaluating the *in vitro* antioxidant capacity, as well as the anti-hyperglycemic and anti-obesity potential, of the hydrophilic (HF), lipophilic (LF), and alkaloid (AF) fractions from five Peruvian tarwi varieties: Andenes-TA, Cholo Fuerte-TCF, Yunguyo-TY, Paton Grande-TPG, and Alta Gracia-TAG. The antioxidant capacity was determined using the DPPH[•] and ABTS^{•+} free radical scavenging assays, while the anti-hyperglycemic and anti-obesity potential were assessed through the *in vitro* inhibitory activity against α -amylase, α -glucosidase, and pancreatic lipase, respectively. The hydrophilic fraction (HF) of the five tarwi varieties showed higher antioxidant capacity (90 to 178 μ mol TE/100 g dw, DPPH[•] method) compared to the lipophilic fraction (LF) (55 to 73 μ mol TE/100 g dw, DPPH[•] method). Higher responses were observed with the ABTS^{•+} assay, where HF exhibited greater values (12608 to 15282 μ mol TE/100 g dw) than LF (445 to 663 μ mol TE/100 g dw) and AF (9629 to 11919 μ mol TE/100 g dw). The HF of the evaluated tarwi varieties showed greater inhibition of α -glucosidase (30,4 to 44,9% at a 10 mg sample dose), whereas the AF stood out for its high inhibition of α -amylase (52,5% to 77,9% at a 50 mg sample dose). The LF showed lower inhibition of α -glucosidase (3,7 to 9,4% at a 10 mg sample dose) and did not inhibit the α -amylase. The TAG and TA varieties exhibited the highest antioxidant capacity as determined by the ABTS^{•+} method, while TY and TCF had the highest antihyperglycemic potential, evidenced by their *in vitro* inhibitory activity against α -glucosidase. Additionally, the AF from TCF variety showed the highest *in vitro* inhibitory activity against α -amylase. It was not possible to determine the anti-obesity potential of tarwi due to the interference of metabolites present in the tarwi fractions with the fluorometric method used to measure the lipase inhibition. This was confirmed by analyzing pure compounds present in AF, such as sparteine and lupanine, which did not show dose-dependent behavior for this activity.

These results provide *in vitro* scientific evidence that support the revalorization of tarwi as a functional food that may play a role in the prevention of metabolic diseases. Furthermore, this study constitutes the biochemical basis for future *in vivo* studies aimed at validating the biological activities observed *in vitro*.

Key words: *Lupinus mutabilis* Sweet, fractions, metabolic diseases.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

HIPÓTESIS 3

OBJETIVOS..... 4

CAPÍTULO I..... 5

1. MARCO TEÓRICO..... 5

1.1. *Lupinus mutabilis* Sweet 5

1.2. Taxonomía..... 5

1.3. Descripción botánica..... 5

1.4. Distribución geográfica 6

1.5. Composición química y nutricional del grano..... 7

1.6. Compuestos bioactivos del tarwi 9

1.6.1. Polifenoles 9

1.6.2. Carotenoides..... 11

1.6.3. Tocoferoles..... 12

1.6.4. Fitoesteroles 12

1.6.5. Alcaloides quinolizidínicos (AQ)..... 13

1.7. Diabetes mellitus 14

1.8. Estrés oxidativo. 15

1.9. Obesidad 18

CAPÍTULO II 20

2. MATERIALES Y MÉTODOS 20

2.1. Lugar de investigación..... 20

2.2. Materiales 20

2.2.1. Material Biológico..... 20

2.2.2. Material de laboratorio	21
2.2.3. Reactivos	21
2.2.4. Enzimas	22
2.2.5. Equipos.....	22
2.3. Métodos	23
2.3.1. Metodología de preparación de las muestras y extracción de las diferentes fracciones	23
2.3.2. Evaluación de las propiedades bioactivas <i>in vitro</i>	24
2.4. Diseño experimental	30
2.5. Análisis estadístico.....	30
CAPÍTULO III	32
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	32
3.1. Capacidad antioxidante de la fracción hidrofílica, lipofílica y la fracción alcaloide de las variedades comerciales de tarwi con los métodos de inhibición de los radicales libres DPPH [•] y ABTS ^{•+}	32
3.2. Potencial antihiperglicémico de las fracciones hidrofílicas, lipofílicas y de la fracción alcaloide de las variedades comerciales de tarwi a través de la inhibición de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa.....	39
3.3. Potencial antiobesidad de las fracciones hidrofílicas, lipofílicas y alcaloide de las variedades comerciales de tarwi a través de la inhibición de la enzima lipasa pancreática.....	47
4. CONCLUSIONES	51
5. RECOMENDACIONES	52
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
7. ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales zonas de producción de tarwi en el Perú en el año 2022.....	7
Tabla 2. Comparación de la composición química de los granos de tarwi y soya (g/100 g)	8
Tabla 3. Ácidos grasos del tarwi (% de ácidos grasos totales)	9
Tabla 4. Clasificación de algunos radicales libres.	16
Tabla 5. Diseño experimental que se siguió para evaluar la capacidad antioxidante, antihiperoglucémicas y antiobesidad de las fracciones hidrofílicas, lipofílicas y alcaloides de las diferentes variedades de tarwi.....	30
Tabla 6. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de los estándares esparteína y lupanina (% inhibición)	48
Tabla 7. Fluorescencia de algunos compuestos bioactivos	48
Tabla 8. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de las fracciones hidrofílica (FH), lipofílica (FL) y alcaloidal (FA) por el método de inhibición del radical libre DPPH [•] ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$).....	70
Tabla 9. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de las fracciones hidrofílica (FH), lipofílica (FL) y alcaloidal (FA) por el método de inhibición del radical libre ABTS ^{•+} ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$)	70
Tabla 10. Control positivo con acarbosa para la α -glucosidasa.	74
Tabla 11. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de la enzima α -glucosidasa (% de inhibición) de semillas de tarwi de diferentes variedades comerciales.	75
Tabla 12. Control positivo con acarbosa para la α -amilasa	78
Tabla 13. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de la enzima α -amilasa (% de inhibición) de semillas de tarwi de diferentes variedades comerciales.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tarwi andino	6
Figura 2. Semillas del tarwi andino.....	6
Figura 3. Estructuras generales de los compuestos fenólicos	10
Figura 4. Estructura básica de los carotenoides	11
Figura 5. Estructura general del tocoferol	12
Figura 6. Principales fitoesteroides	13
Figura 7. Estructura de los principales alcaloides presentes en tarwi	14
Figura 8. Mecanismo de acción de los inhibidores de la α -glucosidasa. a) Función de la α -glucosidasa sobre los carbohidratos. b) Función de la α -glucosidasa sobre los carbohidratos en presencia de un inhibidor de la α -glucosidasa. AG α -glucosidasa, AGI inhibidor α -glucosidasa.	15
Figura 9. Mecanismo de acción de los antioxidantes	17
Figura 10. Mecanismo de acción del Orlistat.....	19
Figura 11. Capacidad antioxidante determinada por el método DPPH [•] de las fracciones hidrofílica (FH) y lipofílica (FL) de diferentes variedades de tarwi, expresada como $\mu\text{mol ET}/100\text{ g bs}$	32
Figura 12. Capacidad antioxidante determinada mediante el método ABTS ^{•+} de las fracciones hidrofílica (FH), lipofílica (FL) y alcaloide (FA) de diferentes variedades de tarwi, expresada como $\mu\text{mol ET}/100\text{ g bs}$	33
Figura 13. Porcentaje de inhibición in vitro de α -glucosidasa de las fracciones hidrofílica (FH) y lipofílica (FL) de variedades de tarwi evaluadas a diferentes dosis muestra	41
Figura 14. Porcentaje de inhibición in vitro de α -amilasa de la fracción alcaloide (FA) de variedades de tarwi a diferentes dosis muestra	42
Figura 15. Curva de calibración utilizada para el análisis de la fracción hidrofílica y alcaloide aplicada en el método de inhibición del radical libre ABTS ^{•+}	68
Figura 16. Curva de calibración utilizada para el análisis de la fracción lipofílica aplicada en el método de inhibición del radical libre ABTS ^{•+}	68
Figura 17. Curva de calibración utilizada para el análisis de la fracción hidrofílica y alcaloide aplicada en el método de inhibición del radical libre DPPH [•]	69
Figura 18. Curva de calibración utilizada para el análisis de la fracción lipofílica aplicada en el método de inhibición del radical libre DPPH [•]	69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ejemplo de curvas de calibración del método de inhibición del radical libre ABTS ^{•+}	68
Anexo 2. Ejemplo de curvas de calibración del método de inhibición del radical libre DPPH [•]	69
Anexo 3. Resultados de la capacidad antioxidante determinados por el método DPPH [•] ...	70
Anexo 4. Resultados de la capacidad antioxidante determinados por el método ABTS ^{•+} ..	70
Anexo 5. Análisis estadísticos de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical DPPH [•] , en 5 variedades de tarwi.	71
Anexo 6. Análisis estadísticos de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical ABTS ^{•+} , en 5 variedades de tarwi.	72
Anexo 7. Control positivo de inhibición de las enzimas digestivas α -glucosidasa utilizando acarbosa.....	74
Anexo 8. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de la enzima α -glucosidasa.....	75
Anexo 9. Análisis estadísticos de la capacidad antihiperglicémica por el método de inhibición de la enzima α -glucosidasa en 5 variedades de tarwi.	76
Anexo 10. Control positivo de inhibición de las enzimas digestivas α -amilasa utilizando acarbosa.....	78
Anexo 11. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de la enzima α -amilasa	79
Anexo 12. Análisis estadísticos de la capacidad antihiperglicémica por el método de inhibición de la enzima α -amilasa en 5 variedades de tarwi.....	80
Anexo 13. Análisis estadístico estándar Esparteina	81
Anexo 14 Análisis estadístico estándar Lupanina.....	81

INTRODUCCIÓN

Alrededor del 75% de las muertes en todo el mundo son causadas por enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) (1). Estas son asociadas a varios factores de riesgo que contribuyen a su desarrollo como son: la diabetes, obesidad y el estrés oxidativo (2).

El Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del Perú (CDC Perú) en un estudio de casos registrados en el periodo de enero 2023 a junio del 2024, informó que se han registrado 54986 casos de diabetes, de los cuales el 97% corresponde a diabetes tipo 2 y el 1.4% a diabetes tipo 1 (3).

Existen medidas para la prevención de la diabetes tipo 2 como el ejercicio, la pérdida de peso y la inclusión de una dieta balanceada. Por lo anterior, es importante buscar alternativas que promuevan una alimentación basada en productos naturales y diversos.

En este contexto, la medicina tradicional ha ganado atención debido al uso de plantas medicinales, que contienen compuestos bioactivos con diversas propiedades relevantes para la salud. Entre ellos destacan los compuestos fenólicos, los cuales han mostrado potencial para la regulación de la glucosa en sangre al actuar como inhibidores de enzimas clave en el metabolismo de carbohidratos, como la α -amilasa y la α -glucosidasa o a través de diferentes mecanismos (4). Asimismo, se ha reportado que estos compuestos presentan un alto potencial antioxidante lo que los hace prometedores para la promoción de la salud humana (5). Por otro lado, están los compuestos no fenólicos como los carotenoides, tocoferoles, etc, asociados con actividades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas, antitumorales y hepatoprotectoras (6)(7).

El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa originaria de la región andina de Perú, Bolivia y Ecuador mientras que otras especies de *Lupinus* como *L. albus* y *L. angustifolius* son de origen mediterráneo (8). Las semillas del tarwi son altamente nutritivas ya que presentan entre 45 a 50% en proteínas y 14 a 24% en lípidos, siendo el contenido proteico del tarwi comparable al de la soja, además de presentar un alto contenido de calcio, zinc, hierro, fibra y de no contener gluten (8). Se han encontrado propiedades hipoglucemiantes (9), posiblemente atribuibles a su contenido de diferentes compuestos bioactivos como los alcaloides, flavonoides y otros metabolitos secundarios (10)(11). Existe evidencia que relaciona los compuestos fenólicos presentes en el tarwi con la actividad antioxidante, incluyendo ácidos fenólicos y flavonoides (12). Otros estudios sugieren que los alcaloides quinolizidínicos, como la lupanina,

tendrían una posible aplicación en el tratamiento de la diabetes tipo 2 al mejorar la secreción de insulina, revelando tener un efecto secretagogo (13). Sin embargo, la evidencia científica sobre las propiedades funcionales relevantes a la salud del tarwi o de sus compuestos bioactivos son limitados, por lo que se requiere más investigaciones sobre el tema.

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar las propiedades antioxidantes, antihiperglicémicas y antiobesidad de las fracciones hidrofílica, lipofílica y alcaloide de variedades comerciales de tarwi a través de ensayos *in vitro*. Estos resultados contribuyen con información científica para promover la revalorización del tarwi como alimento y como fuente de compuestos con potenciales propiedades funcionales relevantes para la prevención de enfermedades metabólicas; y constituyen la base bioquímica para proseguir con estudios *in vivo* que permitan validar las propiedades encontradas.



HIPÓTESIS

Las fracciones hidrofílica, lipofílica, y alcaloide de variedades comerciales de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) presentan propiedades antioxidantes al inhibir los radicales libres DPPH[•] y ABTS^{•+}, propiedades antihiperglicémicas a través de la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa y propiedades antiobesidad al inhibir la enzima lipasa utilizando ensayos *in vitro*.



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar *in vitro* las propiedades antioxidantes, antihiperglicémicas y antiobesidad de las fracciones hidrofílica, lipofílica y alcaloide de variedades comerciales de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet).

Objetivos específicos

- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de la fracción hidrofílica y lipofílica y la fracción alcaloide de variedades comerciales de tarwi a través de la inhibición de los radicales libres DPPH[•] y ABTS^{•+}.
- Evaluar el potencial antihiperglicémico *in vitro* de la fracción hidrofílica, lipofílica y la fracción alcaloide de variedades comerciales de tarwi a través de la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.
- Evaluar el potencial antiobesidad *in vitro* de la fracción hidrofílica, lipofílica y la fracción alcaloide de variedades comerciales de tarwi a través de la inhibición de la enzima lipasa pancreática.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Lupinus mutabilis* Sweet

El tarwi o chocho es una leguminosa de origen andino, fue domesticado hace 1500 años, y en la época incaica se utilizaba como alimento de suma importancia en la dieta de los pobladores altos andinos (14).

Además de su potencial nutricional, desde hace muchos años, el tarwi se ha utilizado para enriquecer los suelos andinos por la capacidad de fijar nitrógeno no atmosférico en cantidades equivalentes a 100 kg/ha restituyendo la fertilidad del suelo (15) (16).

1.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica según Tapia M (17) es:

Taxonomía	
Orden	Fabales
Sub orden	Leguminosae
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Faboideae
Tribu	Geniteae
Género	<i>Lupinus</i>
Especie	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet

*Tapia M (17)

1.3. Descripción botánica

Se caracteriza por tener una raíz que presenta nódulos que llegan a pesar 50 g, estas pueden fijar nitrógeno atmosférico como resultado de la simbiosis entre la raíz y las bacterias del género *Rhizobium*, como la especie *R. lupini*. (17). Generalmente presenta un tallo único de forma cilíndrica (17). Su altura varía de 0.5 a 2.0 metros de altura, siendo aproximadamente de 1 metro (18). El color de las hojas puede variar de un

amarillo verdoso a verde oscuro (19). Las flores poseen 5 pétalos, se pueden encontrar desde blancas, cremas y rosas, aunque las que más predominan son las flores de color azul claro, hasta uno intenso (ver figura 1) (20).



Figura 1. Tarwi andino (17)

En relación a los granos, estos se encuentran en vainas que pueden contener de 5 a 12 semillas. El color de las semillas puede variar entre blanca, gris, marrón, o combinaciones de estas. El tamaño puede variar desde los 0.5 cm hasta los 1.5 cm y existen de diferentes formas, redondas, ovaladas o casi cuadrangulares. Las semillas son cubiertas por un tegumento duro, que representa hasta el 10 % del peso total (21).



Figura 2. Semillas del tarwi andino

* Elaboración propia

1.4.Distribución geográfica

Existen dos grandes grupos de lupinos: los lupinos del viejo mundo (*Lupinus luteus* y *Lupinus albus*) cultivados en España, Italia y Grecia, y los lupinos de la zona andina de

América (*Lupinus mutabilis*). Estos últimos se desarrollan de 2200 a 3500 msnm y se consumen desde Colombia hasta Bolivia (17).

En la Tabla 1 se muestran las regiones productoras de tarwi en el Perú hasta el año 2022. Según el informe estadístico de Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI) las zonas con mayor producción son La Libertad, Cusco, Apurímac, Puno y Huánuco, representando el 85% de la producción total (22).

Tabla 1. Principales zonas de producción de tarwi en el Perú en el año 2022

Región	Producción (toneladas)
La Libertad	4532
Cusco	3913
Apurímac	1695
Puno	1545
Huánuco	1407
Junín	905
Cajamarca	428
Huancavelica	272
Áncash	277
Ayacucho	80
Amazonas	30

*Midagri 2024 (22)

1.5.Composición química y nutricional del grano

Estudios realizados a más de 300 genotipos mostraron que la proteína y el contenido graso del tarwi varía de 41 - 51% y 14 - 24%, respectivamente (23). El tarwi y la soya son legumbres del alto valor nutricional, ambos granos presentan similitudes en su perfil químico como se puede observar en la Tabla 2. Dependiendo de la variedad, el tarwi puede tener un contenido proteico superior a la soya, cuyo contenido oscila entre 35 y

40% (24). Ambas legumbres presentan un contenido lipídico similar, con valores de alrededor de 16% (23).

Tabla 2. Comparación de la composición química de los granos de tarwi y soya (g/100 g)

Componente	Tarwi	Soya
Proteínas	44.3	33.4
Grasas	16.5	16.4
Carbohidratos	28.2	35.5
Fibra	7.1	5.7
Cenizas	3.3	5.5
Humedad	7.7	9.2

*Jacobsen S (23)

En cuanto a la composición proteica, las semillas de tarwi en su estado crudo entero se caracterizan por un elevado contenido de aminoácidos esenciales. Destaca particularmente su concentración de leucina, con 7 g por cada 100 g de proteína. Asimismo, en comparación con otras especies del género *Lupinus*, como *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, el tarwi presenta un contenido superior de lisina, alcanzando los 5.8 g por cada 100 g de proteína (24).

Como se puede observar en la Tabla 3, el aceite de tarwi está constituido principalmente por ácidos grasos insaturados. Siendo el principal el ácido oleico (40.4%) seguido del ácido linoleico (37.1%). La baja concentración del ácido linolénico es beneficioso para su estabilidad, ya que cuando más insaturado sea el ácido graso, mayor es la susceptibilidad a la rancidez oxidativa (16). El ácido linoleico tiene propiedades importantes en el metabolismo humano en etapas específicas como en el embarazo y los primeros meses de vida posparto, además de aumentar las defensas y disminuir la presión arterial; mientras que el ácido oleico reduce el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y es antitumoral (14).

Tabla 3. Ácidos grasos del tarwi (% de ácidos grasos totales)

Ácidos	%
Oleico (Omega 9)	40.4
Linoleico (Omega 6)	37.1
Linolénico (Omega 3)	2.9
Palmítico	13.4
Palmitoleico	0.2
Estearico	5.7
Mirístico	0.6
Araquídico	0.2
Behénico	0.2
Erúsico	0
Cociente	2.0
Polisaturado/Saturado	

*Jacobsen S (23)

1.6. Compuestos bioactivos del tarwi

1.6.1. Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas, se caracterizan por presentar un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilo en su estructura (25). Se pueden clasificar según los anillos fenólicos que poseen y los elementos estructurales que presentan, los principales son: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y alcoholes fenólicos (Figura 3) (26).

Debido a sus propiedades antioxidantes, los compuestos fenólicos pueden prevenir el estrés oxidativo, el cual se relaciona con la etiología de diversos trastornos metabólicos y patologías como la obesidad, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (27).

El tarwi presenta flavonoides, los cuales forman parte de su perfil de metabolitos secundarios. En un estudio reciente se han identificado 13 tipos de isoflavonas principalmente genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona) y sus derivados glicosilados con mono-, di- y trisacáridos; y 8 tipos de flavonas en extractos de tarwi (28).

Los compuestos fenólicos en el tarwi se encuentran en mayor concentración en las semillas amargas con un rango de contenido total de 133 – 153 mg equivalentes de ácido gálico (AGE)/100 g (78), a diferencia de las semillas que pasan por un proceso de desamargado (22- 31 mg AGE/100 g) (79) , debido a que estos compuestos son termolábiles por lo que disminuyen durante el proceso de remojo y ebullición, facilitando su descomposición y oxidación (29). Las isoflavonas presentes en el tarwi se han asociado a propiedades antioxidantes (30) y efectos inhibitorios sobre la enzima α -glucosidasa y α -amilasa a nivel *in vitro* (31).

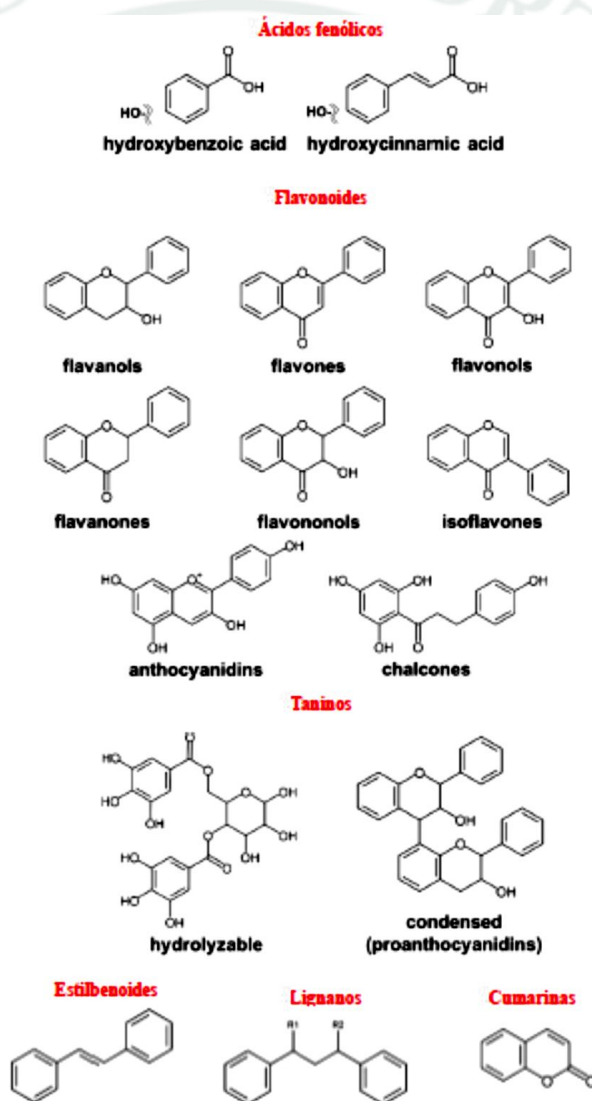


Figura 3. Estructuras generales de los compuestos fenólicos (96)

1.6.2. Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos orgánicos lipofílicos, por lo general están compuestos por dos o más unidades de hidrocarburos del tipo tetraterpénico (Figura 4) (32). Se originan de organismos fotosintéticos como plantas, algas y algunos organismos no fotosintéticos como hongos y bacterias. Son responsables de dar colores del amarillo al rojo en frutas, verduras, hongos y flores (33).

Una dieta rica en carotenoides proporciona provitamina A, además de un potencial antioxidante, antiinflamatorio, mejora de la respuesta inmunitaria y prevención de enfermedades crónicas (34). Entre los tipos de carotenoides existen aquellos que son precursores de la vitamina A como el α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina. Asimismo, están los carotenoides que no son precursores de la vitamina A, como luteína y zeaxantina (33). Según la estructura, los carotenoides se clasifican en carotenos, que solo contienen átomos de carbono e hidrógeno, y xantófilas, que tienen oxígeno en su estructura (7). Estos compuestos están asociados a propiedades antioxidantes, antiinflamatorias (35), anticancerígenas y prevención de enfermedades cardiovasculares (36).

Las principales fuentes de carotenoides son las plantas principalmente flores, frutos y semillas. En el caso las semillas de tarwi, se han detectado luteína en un 73%, zeaxantina en un 15,7%, y β caroteno 4,7%, respecto al contenido total de carotenoides que fue de 4,51 mg/kg (37). De igual manera, en otro estudio realizado en semillas amargas, el contenido total de carotenoides promedio fue de 1,61 mg/kg b.s donde predominó la presencia de luteína aproximadamente en un 76%, seguida de β caroteno en un 17%, de zeaxantina en un 6% y de β -criptoxantina en un 1 % (38).

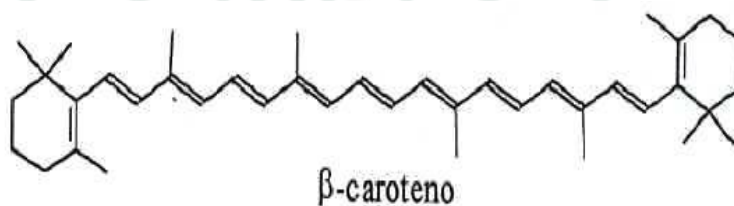


Figura 4. Estructura básica de los carotenoides (97)

1.6.3. Tocoferoles

Los tocoferoles son compuestos antioxidantes lipofílicos pertenecientes a la familia de la vitamina E, esenciales para la protección de las membranas celulares contra el daño oxidativo (Figura 5). Entre ellos, el α -tocoferol es el más relevante desde el punto de vista nutricional, debido a su alta biodisponibilidad y su papel en la prevención de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (39).

Los estudios sobre el contenido de estos compuestos en el tarwi son limitados. Se han encontrado diversos homólogos de tocoferol, incluyendo γ -tocoferol, δ -tocoferol, β -tocoferol y α -tocoferol en harina de semillas de tarwi (40). En otro estudio, las semillas amargas del *L. mutabilis* presentaron una concentración mayor de tocoferoles totales de 204,3 mg/kg en comparación con otras especies como *L. albus* (134,6 mg/kg), *L. angustifolius* (91,9 mg/kg) y *L. luteus* (190,5 mg/kg). La concentración elevada de tocoferoles en el tarwi podría contribuir a su potencial antioxidante y a sus beneficios para la salud, destacándolo como una fuente valiosa de vitamina E en la alimentación humana (38).

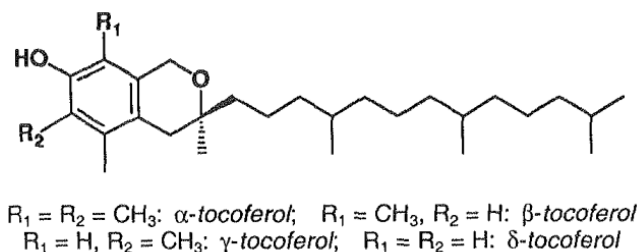


Figura 5. Estructura general del tocoferol (98)

1.6.4. Fitoesteroles

Los fitoesteroles son compuestos bioactivos de origen vegetal, pertenecientes a la familia de los esteroides. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en aceites vegetales, frutos secos, cereales y semillas. Presentan una estructura similar al del colesterol, difiriendo principalmente por la presencia de grupo metilo o etilo (Figura 6) (76).

Los fitoesteroles se clasifican en 4-desmetil, 4-monometil y 4,4-dimetil fitoesteroles, siendo los más abundantes y estudiados los 4-desmetil fitoesteroles, como el β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol (77). Las semillas

de tarwi presentan un alto contenido total de fitoesteroides de 8030 mg/kg de aceite. De este total el 27% corresponde al β -sitosterol seguido del 24-metilenecycloartanol con un 21,1 %, el campesterol con un 19,2 %, y estigmaesterol 13,8 % (37). Estos compuestos han demostrado diversos efectos biológicos, destacando su capacidad para reducir la absorción intestinal del colesterol, así como actividades antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales y anticancerígenas reportadas en estudios *in vitro* e *in vivo* (76).

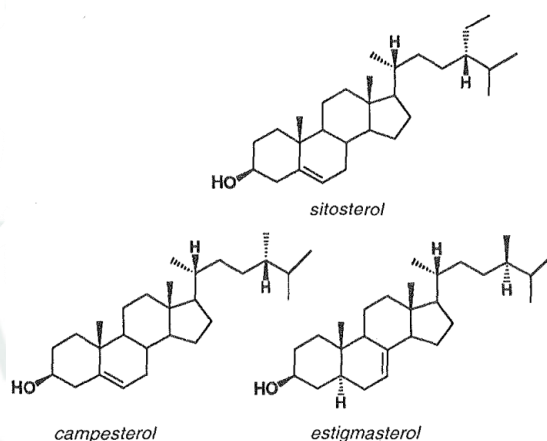


Figura 6. Principales fitoesteroides (98)

1.6.5. Alcaloides quinolizidínicos (AQ)

Los AQ son metabolitos secundarios heterocíclicos nitrogenados derivados de la quinolizidina, utilizados como fuente alimentaria por los humanos y como defensa en las plantas (Figura 7) (41). En las semillas de tarwi se han encontrado concentraciones de AQ que varían según la especie de Lupino, estando en mayor proporción en *L. mutabilis* (2,8 g/100 g de semilla) y en menor proporción en *L. albus* (0,186 g/100 g de semilla) (24). Los AQ con mayor presencia en el tarwi son la lupanina con (46%), esparteína (16%) y la 3-hidroxilupanina (12%), entre otros (42) (75). Estos compuestos confieren el sabor amargo característico de las semillas de lupino, y sobre ciertas concentraciones, producen diversos efectos tóxicos anticolinérgicos agudos en el organismo, tales como; dolor de cabeza, visión borrosa y náuseas (43). Es por ello, que las semillas de tarwi requieren de un proceso de desamargado para el consumo humano cuando superan concentraciones del 0,02% (44).

A pesar de su toxicidad, existen investigaciones donde se han evaluado diversas propiedades biológicas de los AQ, las cuales pueden agruparse en ocho categorías principales: actividad citotóxica, antiviral, antimicrobiana, insecticida, antiinflamatoria, antipalúdica, inhibidora de la acetilcolinesterasa y otras funciones diversas (45).

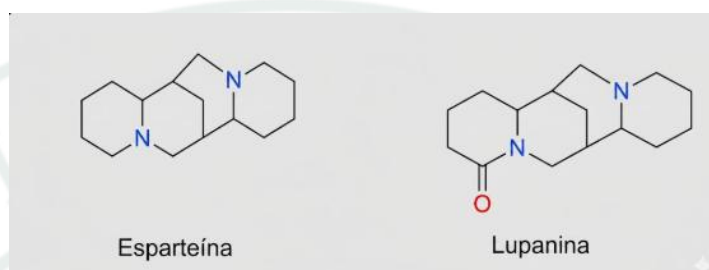


Figura 7. Estructura de los principales alcaloides presentes en tarwi (24)

1.7. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico crónico que se manifiesta por la hiperglucemia, es decir, niveles elevados de glucosa en sangre, siendo la hiperglucemia lo primero que se manifiesta en todos los tipos de diabetes mellitus. Esta condición, a largo plazo, puede desencadenar complicaciones micro y macrovasculares, afectando órganos vitales como el corazón, los ojos, los riñones y el sistema nervioso (99). La diabetes tipo 2, la forma más prevalente, se caracteriza por una resistencia a la insulina o una deficiencia relativa de esta hormona (46).

El tratamiento farmacológico de la diabetes tipo 2 se basa en diversas estrategias dirigidas a mejorar el control glucémico. Entre ellas se encuentra los que disminuyen la resistencia a la insulina (metformina), las que estimulan la secreción de insulina (glibenclamida, gliclazida), las que ayudan a la modulación de las incretinas, (sitagliptina, vildagliptina, linagliptina), o los que actúan ralentizando la absorción de carbohidratos a nivel intestinal a través de la inhibición de la enzima α -glucosidasa como la acarbosa y miglitol (47).

El mecanismo de acción de los inhibidores de la α -glucosidasa se presenta en la Figura 8, estos compuestos actúan inhibiendo de manera competitiva la actividad de la α -glucosidasa en el borde en cepillo del intestino delgado, lo que retrasa la hidrólisis de disacáridos y oligosacáridos en monosacáridos absorbibles. Como resultado, la

absorción de los carbohidratos se ralentiza, reduciendo la velocidad de liberación de glucosa en la sangre (49).

Sin embargo, el uso de los fármacos convencionales se ha asociado a diversos efectos secundarios, como molestias gastrointestinales (flatulencia, dolor de estómago y diarrea), debido a la fermentación de carbohidratos no digeridos en el colon (48). Por ello, el consumo de inhibidores de α -glucosidasa de origen natural a través de la dieta podría representar una estrategia prometedora para prevenir la hiperglucemia y, en consecuencia, el desarrollo de diabetes tipo 2. En este sentido, diversos metabolitos secundarios encontrados en fuentes alimentarias de origen vegetal han demostrado potencial de ser inhibidores de estas enzimas (31).

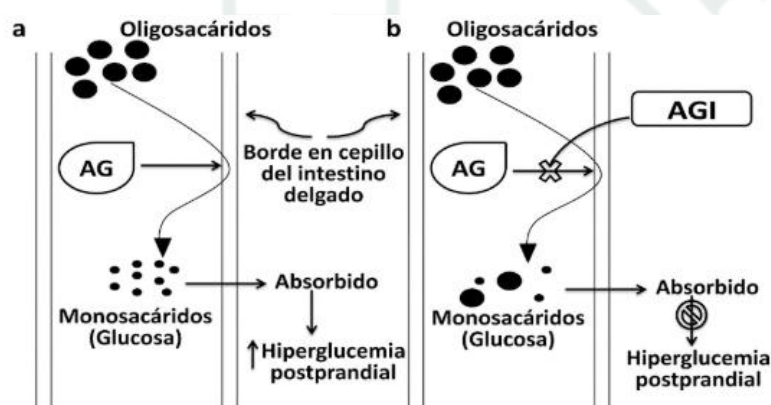


Figura 8. Mecanismo de acción de los inhibidores de la α - glucosidasa. a) Función de la α -glucosidasa sobre los carbohidratos. b) Función de la α -glucosidasa sobre los carbohidratos en presencia de un inhibidor de la α -glucosidasa. AG α -glucosidasa, AGI inhibidor α -glucosidasa. (49)

1.8.Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del sistema antioxidante del organismo para neutralizarlas. Este fenómeno puede causar daño a biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN, lo que está relacionado con el envejecimiento y diversas enfermedades crónicas, como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (50).

El daño celular provocado por los radicales libres puede contribuir al desarrollo de ECNT, como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer. Este estrés induce peroxidación lipídica, daño al ADN y

disfunción mitocondrial, promoviendo inflamación crónica y resistencia a la insulina, factores clave en la progresión de las ECNT (51).

Los radicales libres son átomos o conjunto de átomos que tienen en su último orbital uno o más electrones desapareados. Esta característica les confiere un comportamiento paramagnético, lo que los hace muy inestables y altamente reactivos (52) (53). Son capaces de reaccionar de manera inespecífica con diversas moléculas que componen la estructura celular y tienen la capacidad de atacar cualquier tipo de biomolécula. Debido a su configuración electrónica, estos radicales suelen tener una vida media corta (54).

Existen también las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son moléculas inestables derivadas del oxígeno molecular y que son muy susceptibles a reaccionar con otras moléculas. Existen dos tipos de ROS, lo que son especies radicales libres y los no radicales como, el peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, ozono, entre otras (54). Estas moléculas pueden ser altamente reactivas debido a su capacidad de generar radicales libres y participar en reacciones oxidativas (53). En la tabla 4 se observa la clasificación de algunos de los radicales libres, compuestos principalmente por las ROS, como el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH^\bullet$), radical peróxido ($ROO^\bullet$), radical alcóxido ($RO^\bullet$) y radical hidroperoxilo ($ROOH^\bullet$). Además de las especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico ($NO^\bullet$) y el dióxido de nitrógeno ($NO_2^\bullet$).

Tabla 4. Clasificación de algunos radicales libres.

CLASIFICACIÓN	RADICALES
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	• Superóxido (O_2^-)
	• Radical hidroxilo ($OH^\bullet$)
	• Radical peroxi y alcoxi ($ROO^\bullet$)($RO^\bullet$)
	• Radical hidroperoxilo ($ROOH^\bullet$)
ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO (RNS)	• Óxido nítrico ($NO^\bullet$)
	• Dióxido de nitrógeno ($NO_2^\bullet$)

* Fernández J (55)

Diversos factores exógenos pueden favorecer el aumento de radicales libres en el organismo, la exposición a los rayos X, el ozono, el tabaquismo, los contaminantes del aire y los productos químicos industriales. Asimismo, ciertos fármacos, pesticidas y drogas recreativas pueden inducir la generación de radicales libres, contribuyendo al daño oxidativo en el organismo (51).

El ser humano dispone de sistemas antioxidantes endógenos y exógenos para proteger al organismo de los radicales libres. Un antioxidante es una molécula estable y tiene la capacidad donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad de daño (56). Estos antioxidantes retrasan o inhiben el daño celular principalmente a través de su propiedad de eliminación de radicales libres (57). En la Figura 9 se muestra el mecanismo general de acción de los compuestos antioxidantes.

Los antioxidantes endógenos incluyen enzimas como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), que degradan las ROS en productos menos tóxicos. Sin embargo, también existen los antioxidantes exógenos los cuales son compuestos provenientes de la dieta, como las vitaminas C y E, polifenoles y carotenoides, que actúan donando electrones a los radicales libres, de esta forma las vuelve estables, reduciendo el estrés oxidativo (51).

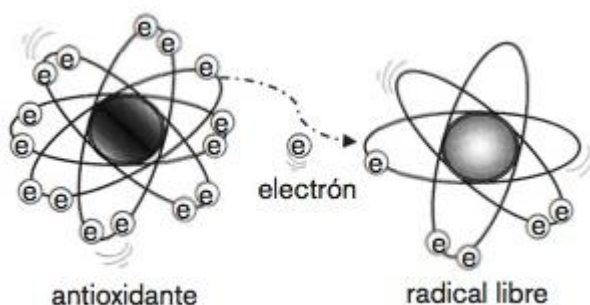


Figura 9. Mecanismo de acción de los antioxidantes (58)

De acuerdo con diversos estudios *in vivo* y ensayos clínicos se está evidenciando que el consumo de alimentos con altos contenidos de compuestos con capacidad antioxidante disminuye el riesgo de las ECNT. En un estudio evaluando las propiedades del té verde en 123 pacientes prediabéticos provenientes de la República de Mauricio, el grupo experimental consumió 3 tazas de té verde al día durante 14 semanas, seguidas de un período de lavado de 2 semanas. Asimismo, se evaluó el contenido total de compuestos fenólicos del té verde y su relación antioxidante. Se reportó que luego del consumo

durante 14 semanas, se suprimió la presión arterial media tanto en mujeres como en varones. Los autores suponen que el té verde podría mejorar las características del síndrome metabólico y los riesgos posteriores de diabetes y sus complicaciones (59). En otro estudio realizado en ratas blancas Wistar, se les administró compuestos fenólicos a partir del extracto obtenido del fruto de *Sambucus nigra* por 2 días y durante 8 semanas. Se obtuvo que los extractos fenólicos generaron un efecto antioxidante, también se observó que la presión sistólica y diastólica disminuyeron en ratas con hipertensión inducida por fármacos (60).

Por lo anterior, es factible la modulación del estrés oxidativo a través de la dieta, sin embargo, la investigación científica debería realizarse caso a caso.

1.9. Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por una acumulación excesiva de grasa corporal que puede afectar la salud. Se asocia con un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético, influenciado por factores genéticos, metabólicos, ambientales y conductuales (61). Esta condición aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares (62).

Entre las estrategias farmacológicas utilizadas para el tratamiento de la obesidad, destaca el uso de inhibidores de la lipasa pancreática, la cual es clave en la digestión de los triglicéridos de la dieta, ya que cataliza su descomposición en monoglicéridos y ácidos grasos libres en el intestino delgado. Es secretada por el páncreas en forma de proenzima y activada en presencia de sales biliares y colipasa, una proteína cofactora esencial para su función en un ambiente acuoso (63). Al inactivar esta enzima, por ejemplo, con fármacos convencionales como el orlistat, los triglicéridos de los alimentos no pueden ser descompuestos en ácidos grasos, lo que impide que el intestino los absorba y los almacene como tejido adiposo (Figura 10) (64).

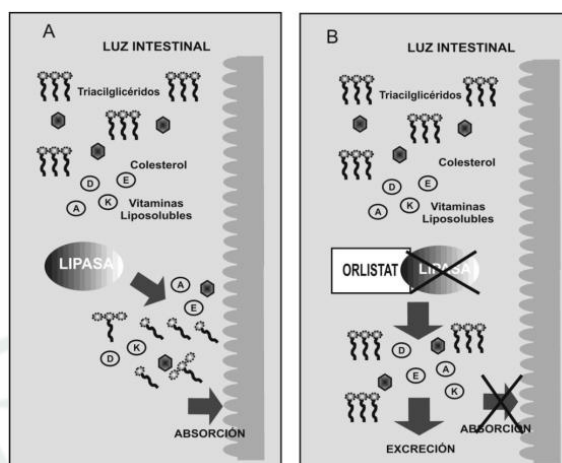


Figura 10. Mecanismo de acción del Orlistat (65)

En la actualidad, el único fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en el tratamiento contra la obesidad pancreática través de este mecanismo es el Orlistat, el cual actúa en la cavidad gástrica y en la luz del intestino delgado mediante la formación de un enlace covalente con el sitio activo de las lipasas gástrica y pancreática inhibiendo la escisión de los triacilglicéridos en ácidos grasos libres y monoglicéridos absorbibles (64)(65). Sin embargo, se reportan efectos adversos como heces grasosas, incremento de la flatulencia, incontinencia fecal y trastornos en la absorción de vitaminas liposolubles, entre otros (66)

Por lo anterior, cada vez más se está investigando el consumo de inhibidores de origen natural de esta enzima. Algunos estudios han reportado que ciertos metabolitos secundarios de origen vegetal tienen la capacidad de inhibir esta enzima. Así, en un ensayo *in vitro* de los compuestos fenólicos (ácido p-cumárico y ácido cafeico) del chile jalapeño demostró una inhibición mixta de estos compuestos frente la enzima lipasa pancreática (67). Otro ensayo *in vivo* mostró que a la administración de quercetina en ratas podría reducir significativamente la absorción de grasa inhibiendo la enzima lipasa pancreática (100).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Ciencia de los Alimentos del Vicerrectorado de Investigación, pabellón F, Laboratorio F-404, campus central de la Universidad Católica de Santa María (UCSM), en la provincia de Arequipa, Arequipa, Perú.

2.2. Materiales

2.2.1. Material Biológico

Las semillas de tarwi fueron proporcionadas 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. Estas corresponden a 5 variedades comerciales; Andenes (TA), Cholo fuerte (TCF), Yunguyo (TY), Paton Grande (TPG) y Alta Gracia (TAG). Los granos fueron almacenados en bolsa de papel Kraft a 5 °C hasta su análisis. 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 (<https://www.gob.pe/institucion/inia/normas-legales/7491763-015-2025-inia-dgia>). 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 antihiper glucémico, antioxidante, y antiobesidad en muestras comerciales peruanas”.

2.2.2. Material de laboratorio

- Balón 250 mL.
- Botellas de vidrio con tapa rosca 100 mL, 500 mL.
- Fiola de 100 mL, 250 mL.
- Fiola ámbar de 100 mL, 250 mL.
- Frascos ámbar 100 mL, 250 mL.
- Gotero
- Micropipetas de 0.2-20 μ l, 20-100 μ l, 100-1000 μ l y 500-5000 μ L.
- Microplacas de poliestireno transparente de 96 pocillos de 400 μ L c/u.
- Microplacas de polipropileno de 96 pocillos de 400 μ L c/u.
- Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 mL.
- Probetas de 10, 50, 100 y 500 mL.
- Tamiz No 35 de 500 μ m.
- Tubos de centrifuga 15 y 50 mL.
- Tubos de ensayo de 25 mL.
- Microtubos de 2 mL.
- Vasos de precipitado 50 y 250 mL.

2.2.3. Reactivos

- 4-Methylumbelliferyl oleato (Sigma-Aldrich, EE. UU).
- 4-p-nitrofenil- α -D-glucopiranososa (p-NFGP) (Sigma-Aldrich, EE. UU).
- ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) (Sigma-Aldrich, EE. UU).
- Acarbosa (Sigma-Aldrich, EE. UU).
- Ácido tricloroacético 5% (Merck, Alemania).
- Ácido dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich, EE. UU).
- Almidón (Merck, Alemania).
- Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de calcio dihydrate (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de sodio (Merck, Alemania).
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Sigma-Aldrich, EE. UU).
- Diclorometano (Merck, Alemania).

- Difosfato de Sodio (Merck, Alemania).
- Fosfato Dipotásico (Merck, Alemania).
- Fosfato Disódico (Merck, Alemania).
- Fosfato Mono potásico (Merck, Alemania).
- Hidróxido de sodio (Merck, Alemania).
- Metanol (Merck, Alemania).
- Orlistat (Sigma-Aldrich, EE. UU).
- Tartrato de sodio y potasio (Merck, Alemania).
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, EE. UU).
- Trolox (6 – hidroxí - 2, 5, 7, 8 –tetrametilcroman–2- ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich, EE. UU)

2.2.4. Enzimas

- α -Amilasa pancreática (Type VI-B, ≥ 10 unid/mg; Sigma, A3176-10 MU), Número EC 232-565-6.
- α -Glucosidasa de levadura (Sigma, G5003-100UN), Número EC 232-604-7.
- Lipasa pancreática de porcino (Type II, ≥ 125 units/mg Sigma, L3126-100G), Número EC 232-619-9.

2.2.5. Equipos

- Agitador vórtex (Wizard Advance IR, Velp Scientifica, Italia)
- Agitador orbital (MAXQ 2000, Thermo Scientific, EE. UU)
- Balanza Semi-Micro Analítica (TM, PX 4201, PIONEER, OHAUS, EE. UU)
- Balanza de Precisión (Explorer EX225D, OHAUS, EE. UU)
- Campana extractora (FHI800(P), BIOBASE, EE. UU.).
- Centrífuga (Universal 320 R, Hettich, Alemania).
- Enfriador para rotavapor (F250, JULABO, Alemania).
- Espectrofotómetro UV-VIS (Gensys 150, Thermo Scientific, EE. UU).
- Lector de microplacas con detector UV-VIS y fluorescencia (Synergy HTX, BioTek, EE. UU).
- Molino analítico (A 11 BASIC, IKA, Alemania).
- Potenciómetro (HI 3220, Hanna, Italia).

- Sistema de rotaevaporación (bomba de vacío, baño y rotavapor) (BUCHI, B-100, Alemania).

2.3.Métodos

2.3.1. Metodología de preparación de las muestras y extracción de las diferentes fracciones

2.3.1.1.Preparación de la muestra

Los granos de tarwi fueron procesados en un molino analítico hasta un tamaño de partícula de 500 μm utilizando una malla N°35. Las harinas obtenidas se almacenaron en bolsas de polietileno de alta densidad a una temperatura de -18°C hasta su análisis.

2.3.1.2.Extracción de la fracción hidrofílica y lipofílica

Se realizó según el método planteado por Fuentealba et al (68), con algunas modificaciones. Se pesaron 0,2 g de muestra en polvo de tarwi en un tubo de centrífuga de 50 mL, se añadieron 5 mL de metanol al 80% en agua y se llevaron a agitación durante 30 minutos a 230 rpm a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se centrifugó a 7500 rpm por 15 minutos a 4°C , se separó el sobrenadante resultante y se almacenó a -20°C hasta su análisis. Esta fracción correspondió a la fracción hidrofílica.

Al pellet resultante se le agregó 2 mL de diclorometano, se sometió a agitación por 30 minutos a 230 rpm temperatura ambiente y luego se centrifugó a 7500 rpm por 15 minutos a 4°C . El sobrenadante se separó y se almacenó a -20°C hasta su análisis. Estos extractos correspondieron a la fracción lipofílica.

2.3.1.3.Extracción de la fracción alcaloide

La extracción de los AQ, característicos del grano de tarwi fueron realizados aplicando el método específico para la separación de estos compuestos y reportado por Muzquiz (69) con algunas modificaciones. El método consistió en realizar primero una extracción en medio ácido para lo cual se mezclaron 0,5 g de harina de tarwi con 2,5 mL ácido tricloroacético al 5%, y se homogenizó durante un 1 minuto, luego se dejó en agitación orbital por 30 minutos a 200 rpm, seguido de una centrifugación por 5 minutos a 5000 rpm, al terminar el tiempo de centrifugación se

separó el sobrenadante, se procedió a una reextracción con ácido tricloroacético al 5%, por 2 veces más en el pellet resultante, por el mismo tiempo y a las mismas revoluciones. Los sobrenadantes del paso anterior fueron mezclados, y el medio se alcalinizó con 0,5 mL de NaOH 10 M y se procedió a extraer 3 veces los AQ con 10 mL de diclorometano, luego se recuperó la fase orgánica. Finalmente, se evaporó al vacío a sequedad y se suspendió con 2 mL metanol o solución buffer según el tipo de análisis de inhibición enzimática a realizar.

2.3.2. Evaluación de las propiedades bioactivas *in vitro*

2.3.2.1. Evaluación de la capacidad antioxidante

2.3.2.1.1. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical ABTS^{•+}

Se aplicó el método descrito por Fuentealba et al. (68) con algunas modificaciones. El radical libre ABTS^{•+} fue preparado a partir de la reacción del ABTS (78,4 mg/10 mL) con persulfato de potasio (13,2 mg/10 mL), ambos reactivos fueron diluidos en agua ultrapura, se mezclaron ambas soluciones y se dejaron bajo agitación orbital por 12 horas a temperatura ambiente a 120 rpm previamente protegido a la luz, la solución resultante fue diluida con etanol absoluto hasta llegar a una absorbancia entre $0,75 \pm 0,02$ a 734 nm de longitud de onda.

Para la reacción, se colocó en una microplaca de 96 pozos 250 μ L del reactivo ABTS^{•+} con 40 μ L de los extractos de las muestras (fracciones hidrofílicas, lipofílicas y alcaloide). Luego de un periodo de incubación de 30 minutos a 20 °C, se midió la absorbancia a 734 nm en un lector de microplacas. En cada corrida analítica, se tuvo que considerar el control (metanol para la fracción hidrofílica/alcaloide y diclorometano para la fracción lipofílica), una curva estándar de solución Trolox. El Trolox se disolvió en metanol o diclorometano para el análisis de las fracciones hidrofílicas/alcaloide y lipofílicas, respectivamente. El % de inhibición se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(Abs\ c - Abs\ m)}{Abs\ c} * 100$$

Donde:

Abs c = absorbancia del control a 734 nm

Abs m = absorbancia de la muestra o punto de la curva a 734 nm

Se realizó una curva de calibración del estándar Trolox construida a diferentes concentraciones, de 20 a 160 µM para el análisis de la fracción hidrofílica y de 20 a 140 µM para la fracción lipofílica versus el % de inhibición, luego los resultados fueron expresados en µmoles equivalentes de Trolox/100 g de muestra en base seca (bs). (Anexo 1)

2.3.2.1.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical DPPH[•]

Se aplicó el método de Duarte-Almeida (70), con algunas modificaciones. Se preparó una solución stock de radical DPPH[•] en metanol (12,5 mg/100 mL), a partir de la cual se realizó una dilución con metanol a 2,5 mg/100 mL. Para la reacción, se colocó en una microplaca de 96 pozos 250 µL del radical DPPH[•] con 40 µL de los extractos de las muestras (fracción hidrofílica, lipofílica y alcaloide). Luego de un periodo de incubación de 25 minutos a 25 °C se procedió a medir la absorbancia a 517 nm en un lector de microplacas. Al igual que en el método anterior, en cada corrida analítica se consideró un control (metanol para las fracciones hidrofílicas/alcaloide y diclorometano en caso de la fracción lipofílica), una curva estándar de solución Trolox. El Trolox se disolvió en metanol o diclorometano para el análisis de fracciones hidrofílicas/alcaloide y lipofílicas, respectivamente. El % de inhibición se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(Abs\ c - Abs\ m)}{Abs\ c} * 100$$

Donde:

Abs c = absorbancia media del control a 517 nm

Abs m = absorbancia media de la muestra o punto de la curva a 517 nm

Se realizó una curva de calibración del estándar Trolox construida a diferentes concentraciones, de 20 a 160 µM para el análisis de la fracción hidrofílica y de

20 a 140 μM para la fracción lipofílica versus el % de inhibición, luego los resultados fueron expresados en μmoles equivalentes de Trolox/100 g de muestra en base seca (bs). (Anexo 2)

2.3.2.2. Evaluación de la actividad antihiper glucémica

2.3.2.2.1. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

La actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa se determinó según lo propuesto por el Manual Enzimático de Worthington (71), con algunas modificaciones según Ranilla et al (72). El método se basa en la hidrólisis enzimática del sustrato de origen sintético, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, (p-NFGP) que por acción de la α -glucosidasa (α -GLC), libera unidades de p-nitrofenolato y α -D-glucosa. El ion p-nitrofenolato presenta una coloración amarillo claro que evidencia que la reacción de hidrólisis enzimática se ha llevado a cabo. La disminución de la hidrólisis resulta en la pérdida de color del reactante, la cual ocurre de forma proporcional a la concentración de los inhibidores presentes en los extractos.

En una microplaca de 96 pocillos se dejó incubando 50 μL de los extractos de tarwi (fracciones hidrofílicas, lipofílicas y alcaloides) con 50 μL de buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.9) y 100 μL de la enzima α -glucosidasa (1.0 U/mL) preparada en buffer de fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.9) a temperatura 25 °C durante 10 minutos.

Después de la pre-incubación, se agregó 50 μL de una solución p-NFGP 5 mM en buffer de fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.9); la mezcla reactante se incubó a 25 °C por 5 minutos.

Se registraron las absorbancias en un lector de microplacas antes y después (a tiempo 0 y a los 5 minutos) de la incubación a 405 nm. Asimismo, se registró la absorbancia de un control (50 μL de buffer en lugar del extracto), un control positivo de inhibición enzimática (50 μL de acarbosa a 5 mg/mL en vez del extracto) y un blanco muestra (buffer en lugar de la solución enzimática). Los resultados se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta Abs c - \Delta Abs m}{\Delta Abs c} * 100$$

Donde:

$\Delta \text{ Abs c}$ = diferencia de la absorbancia media del control 5 minutos y 0 minutos a 405 nm

$\Delta \text{ Abs m}$ = diferencia de la absorbancia media de la muestra 5 minutos y 0 minutos 405 nm

Las absorbancias del tiempo 0 minutos fueron restadas del tiempo 5 minutos. Los resultados se expresaron como % de inhibición y las diferentes fracciones fueron evaluadas 3 diferentes concentraciones de muestra (mg).

2.3.2.2.2. Actividad inhibitoria de la α -amilasa

La actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa se determinó según el ensayo del Manual Enzimático de Worthington (73) con algunas modificaciones según Ranilla et al. (72). El método consiste en la disminución de la hidrólisis enzimática que resulta en la pérdida de color del compuesto reactante ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) según los compuestos inhibidores presentes en los extractos evaluados. En presencia de azúcares reductores, el DNS se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, lo que produce un cambio de color de amarillo a anaranjado o rojo pardo oscuro que se puede medir por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. La intensidad del color generado dependerá de la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Se incubó 100 μl de cada extracto de las muestras de tarwi (fracciones hidrofílicas, lipofílicas y alcaloides) y 100 μl de la enzima α -amilasa (0.5 mg/ml) contenida en buffer fosfato de sodio 0.02 M (pH 6.9 con NaCl 0.006 M) a temperatura 25°C durante 10 minutos en un tubo de ensayo. Luego se añadió 100 μl de una solución de almidón al 1% en buffer fosfato de sodio 0.02 M (pH 6.9 con NaCl 0.006 M) a temperatura 25°C durante 10 minutos. Para finalizar se agregó 200 μl del reactivo de color DNS y las muestras se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. La mezcla fue diluida con 3 ml de agua destilada, y se mezcló bien. Para la lectura se colocó 290 μl de cada tubo en una microplaca de 96 pocillos. También se registraron la absorbancia de un control (buffer en lugar del extracto de muestra), un control de inhibición positiva (acarbose a 1mg/mL

en lugar del extracto muestra) y un blanco de muestra (buffer en lugar de la solución enzimática). La absorbancia se obtuvo al restar la absorbancia del blanco de muestra a las lecturas de absorbancia de las muestras. Los resultados se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(Abs\ c - (Abs\ em - Abs\ bm))}{Abs\ c} * 100$$

Donde:

Abs c = absorbancia media del control a 540 nm

Abs em = absorbancia media del extracto muestra 540 nm

Abs bm = absorbancia media del blanco muestra 540 nm

Los resultados se expresaron como % de inhibición y las diferentes fracciones fueron evaluadas 3 diferentes concentraciones de muestra (mg).

2.3.2.3. Evaluación de la actividad antiobesidad

2.3.2.3.1. Actividad inhibitoria de la enzima lipasa pancreática

La actividad de inhibición de la enzima lipasa pancreática se midió por el método propuesto por Nakai M (74) con algunas modificaciones. El método consiste en la hidrólisis enzimática del 4-metilumbeliferil oleato, que por acción de la enzima lipasa, libera unidades de 4-metilumbeliferona y ácido oleico generando un aumento en la intensidad de la fluorescencia. La disminución de la hidrólisis resulta en la pérdida de la fluorescencia, la cual ocurre de forma proporcional a la presencia de inhibidores en los extractos.

En una microplaca de 96 pozos se añadió 50 µL de extracto de muestra de tarwi (fracciones hidrofílicas, lipofílicas y alcaloides) junto con 100 µL de solución 0.1 mM de 4-metilumbeliferil oleato disuelto en buffer pH 8.0 compuesto por 13 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y 1.3 mM de CaCl₂.H₂O y se dejó atemperando por 1 minuto a 37°C. Para iniciar la reacción se agregó 50 µL de solución de lipasa disuelta en el mismo buffer y se dejó incubando a 37 °C por 15 minutos. Se midió la liberación de la 4-metilumbeliferona por efecto de la lipasa pancreática en un lector de microplacas de fluorescencia a una λ

excitación de 360 nm y una λ emisión de 460 nm. La actividad inhibidora de la lipasa pancreática se expresó como porcentaje de inhibición respecto a un control (buffer en lugar del extracto de muestra). Como control positivo de inhibición se usó Orlistat (10.1 μ M y 200 μ M disuelto en MeOH). El % de inhibición se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhbición} = \frac{(flu\ c - flu\ m)}{flu\ c} * 100$$

Donde:

flu c = fluorescencia media del control 15 minutos.

flu m = fluorescencia media de la muestra 15 minutos.

Los resultados se expresaron como % de inhibición y las diferentes fracciones fueron evaluadas 3 diferentes concentraciones de muestra (mg).

2.4. Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental aleatorio, donde se tuvieron 2 factores (variedad y tipo de fracción), y las variables respuesta correspondientes a los resultados de capacidad antioxidante, antihiperlipidémicas y antiobesidad, según se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental que se siguió para evaluar la capacidad antioxidante, antihiperlipidémicas y antiobesidad de las fracciones hidrofílicas, lipofílicas y alcaloides de las diferentes variedades de tarwi.

TRATAMIENTOS			VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLES DEPENDIENTES	UNIDADES
Nº	Variedad	Fracción		Inhibición del radical DPPH [•] Inhibición del radical ABTS ^{•+}	(μ mol Trolox/ 100 g BS)
1.	Tarwi andenes (TA)	Hidrofílica	Variedad y Tipo de fracción del tarwi.		
2	Tarwi andenes (TA)	Lipofílica			
3	Tarwi andenes (TA)	Alcaloides			
4	Tarwi Cholo Fuerte (TCF)	Hidrofílica			
5	Tarwi Cholo Fuerte (TCF)	Lipofílica		Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. Actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa	% de inhibición
6	Tarwi Cholo Fuerte (TCF)	Alcaloides			
7	Tarwi Yunguyo (TY)	Hidrofílica			
8	Tarwi Yunguyo (TY)	Lipofílica			
9	Tarwi Yunguyo (TY)	Alcaloides			
10	Tarwi Paton Grande (TPG)	Hidrofílica		Actividad inhibitoria de la enzima lipasa pancreática.	% de inhibición
11	Tarwi Paton Grande (TPG)	Lipofílica			
12	Tarwi Paton Grande (TPG)	Alcaloides			
13	Tarwi Alta Gracia (TAG)	Hidrofílica			
14	Tarwi Alta Gracia (TAG)	Lipofílica			
15	Tarwi Alta Gracia (TAG)	Alcaloides			

* Elaboración propia

2.5. Análisis estadístico

Todas las extracciones de cada tipo de fracción evaluada se realizaron por cuadruplicado ($n = 4$) y los ensayos analíticos fueron realizados por triplicado ($n = 3$). Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ desviación estándar. Se aplicó un ANOVA de dos vías para cada ensayo. Previamente, se verificaron los supuestos de normalidad (Shapiro-

Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). Cuando estos no se cumplieron, se utilizó el método no paramétrico Aligned Rank Transform (ART). Adicionalmente, cuando fue necesario analizar un solo factor de manera independiente, se aplicó un ANOVA de una vía, verificando igualmente sus supuestos y aplicando pruebas post hoc correspondientes. En los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba de Tukey (HSD). El análisis se realizó en R (versión 4.5.2).



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Capacidad antioxidante de la fracción hidrofílica, lipofílica y la fracción alcaloide de las variedades comerciales de tarwi con los métodos de inhibición de los radicales libres DPPH[•] y ABTS^{•+}

Los resultados de la capacidad antioxidante *in vitro* evaluada con el método de inhibición del radical DPPH[•] de las fracciones hidrofílica (FH), lipofílica (FL) y alcaloide (FA) obtenidas a partir de cinco variedades comerciales de semillas de tarwi se presentan en la (Figura 11).

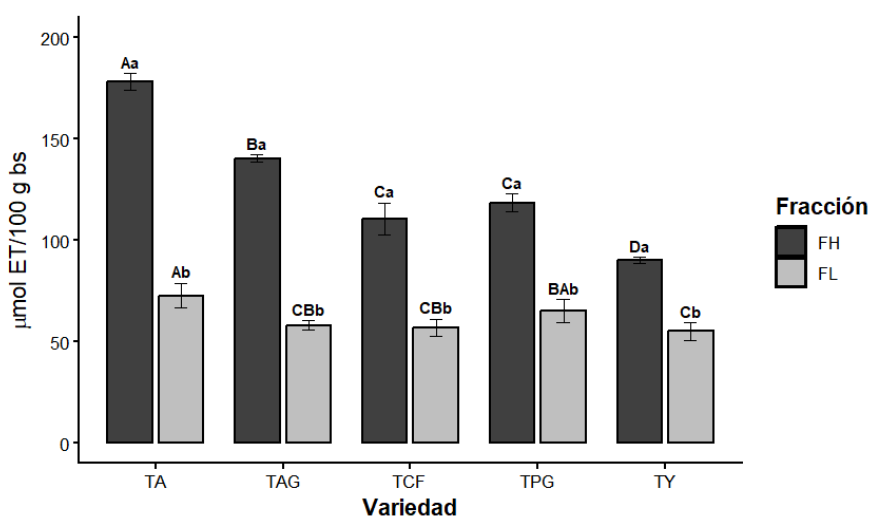


Figura 11. Capacidad antioxidante determinada por el método DPPH[•] de las fracciones hidrofílica (FH) y lipofílica (FL) de diferentes variedades de tarwi, expresada como $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar ($n = 4$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre variedades dentro de una misma fracción, y letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre fracciones dentro de una misma variedad, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Los resultados completos se presentan en el Anexo 3.

La FH presentó los valores más elevados de capacidad antioxidante de $90,1 \pm 1,6$ a $178,2 \pm 4,1 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$, en comparación de la FL con valores de $55,2 \pm 4,3$ a $72,8 \pm 6,1 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$. LA FH aportó aproximadamente en más del 65% de la capacidad

antioxidante total, mientras que la FL contribuyó alrededor del 35 %. Estos resultados indican que la FH es la principal responsable de la actividad antioxidante total con este método.

En relación con la FA, esta no presentó actividad antioxidante detectable en la mayoría de las variedades analizadas con el método de inhibición del DPPH[•], con excepción de la variedad TAG, que mostró una capacidad antioxidante baja ($8,3 \pm 2,2 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$).

Asimismo, se puede observar que las variedades TAG y TA presentaron los valores más altos de capacidad antioxidante en la FH con valores referidos de $140,4 \pm 1,8$ y $178,2 \pm 4,1 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$ respectivamente, las mismas tendencias se reflejaron en el valor total, por lo que ambas variedades presentaron mayor capacidad antioxidante.

En la Figura 12 se muestran los resultados de la capacidad antioxidante *in vitro* evaluada con el método de inhibición del radical ABTS^{•+} de las FH, FL y FA obtenidas a partir de cinco variedades comerciales de semillas de tarwi. Se observó la misma tendencia que en el método de inhibición del radical DPPH[•]. La FH presentó los valores más elevados de capacidad antioxidante con rangos que oscilaron entre 12608 ± 252 y $15283 \pm 548 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$ en comparación con la FL, cuyos valores fueron considerablemente menores, variando entre 445 ± 17 y $663 \pm 25 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$. En este caso, la FH contribuyó significativamente a la capacidad antioxidante total, representando aproximadamente un 96% del total.

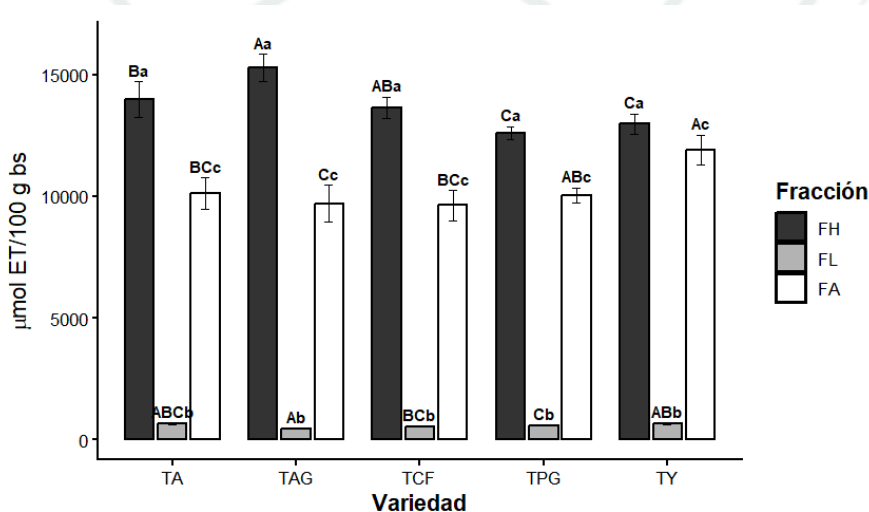


Figura 12. Capacidad antioxidante determinada mediante el método ABTS^{•+} de las fracciones hidrofílica (FH), lipofílica (FL) y alcaloide (FA) de diferentes variedades

de tarwi, expresada como $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar ($n = 4$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre variedades dentro de una misma fracción, mientras que letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre fracciones dentro de una misma variedad, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Los resultados completos se presentan en el Anexo 4.

A diferencia de lo observado con el método de inhibición del DPPH $^{\bullet}$, la FA mostró una capacidad antioxidante considerable en todas las variedades analizadas, con valores que oscilaron entre 9629 ± 614 y $11\,919 \pm 610 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$, lo que sugiere que los alcaloides presentes contribuyen de manera relevante a la neutralización del radical ABTS $^{\bullet+}$. Además, la actividad antioxidante de la FA fue consistentemente superior a la FL y mostró una tendencia y rangos muy similares a los presentadas por la FH, lo que indicaría que la FH podría contener también alcaloides. Algunas publicaciones han detectado AQ como lupanina y esparteína además compuestos fenólicos totales, presentes en extractos etanólicos al 80% en harinas desamargadas de tarwi (79). En este sentido, es razonable plantear que los AQ, predominantes en el tarwi ($2,8 \text{ g}/100 \text{ g}$) (24), no solo están concentrados en la FA, sino que también estarían presentes en la FH. La presencia simultánea de compuestos fenólicos y alcaloides en la FH podría explicar la actividad antioxidante observada, indicando que la capacidad antioxidante del tarwi no depende exclusivamente de los fenoles, sino del efecto combinado de diferentes grupos de metabolitos bioactivos. Desde el punto de vista químico, los alcaloides poseen átomos de nitrógeno con pares de electrones libres, lo que les permite participar en reacciones de transferencia de electrones, ya sea como donadores o como aceptores. Mecanismos clave en los ensayos DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{\bullet+}$ (83). Por tanto, la contribución potencial de los alcaloides a la actividad antioxidante de la FH constituye a una posible hipótesis que complementa la interpretación basada únicamente en compuestos fenólicos u otros tipos de antioxidantes.

Al igual que lo observado en los resultados de capacidad antioxidante con el método de inhibición del radical DPPH $^{\bullet}$, las variedades TA y TAG presentaron los valores más elevados de capacidad antioxidante en la FH, con valores de 13974 ± 744 y $15283 \pm 548 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$, respectivamente. Esta misma tendencia se reflejó en la capacidad antioxidante total, destacando que ambas variedades presentaron el mayor potencial antioxidante. En cuanto a la FA se observó una mayor capacidad antioxidante en la

variedad TY ($11919 \pm 610 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$), quizás relacionada a que esta variedad presenta un mayor porcentaje de alcaloides totales, pero esto debe ser investigado a futuro.

El análisis conjunto de la capacidad antioxidante determinada mediante los ensayos ABTS^{•+} y DPPH[•] evidenció que los valores obtenidos con el método ABTS^{•+} fueron consistentemente superiores a los registrados con el radical DPPH[•]. Esta tendencia coincide con lo reportado por Córdova et al. y Choquetico et al. (78)(79), quienes también observaron una mayor capacidad antioxidante cuando emplearon el ensayo ABTS^{•+} en comparación con el método de inhibición del DPPH[•]. Córdova et al. (78) reportaron para las variedades TAG, TA y TY valores de 14672, 15620 y 14739 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$, respectivamente, mediante el ensayo ABTS^{•+}, mientras que con el método de inhibición del DPPH[•] obtuvieron valores considerablemente menores 539, 528 y 509 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$. De manera similar, Choquetico et al (79) informaron para las variedades TAG y TCF valores de 477 y 733 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$ con el método de inhibición del ABTS^{•+}, frente a 15 y 56 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$ con el ensayo de DPPH[•]. Estos antecedentes respaldan la tendencia observada en el presente estudio y sugieren que las diferencias no responden únicamente a la matriz evaluada, sino también a las características propias de cada método. Mareček et al (85), indica que el mecanismo de reacción del radical DPPH[•] frente a compuestos antioxidantes es limitada debido a que es muy estable y por ende menos reactivo que el radical ABST^{•+}, el cual se forma a partir de un oxidante, como el persulfato de potasio, lo cual lo hace menos estable y más transitorio. Otra diferencia relevante entre ambos ensayos es que el radical ABTS^{•+} puede disolverse en medios acuosos u orgánicos y presenta una mayor reactividad y sensibilidad con compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el radical DPPH[•] solo actúa con antioxidantes de naturaleza hidrofílica debido que solo es soluble en medios orgánicos, lo cual representa una limitación (86).

La información científica disponible sobre la capacidad antioxidante del tarwi aún es limitada, especialmente cuando se evalúan fracciones específicas de las semillas. En el presente estudio, la capacidad antioxidante determinada mediante el método de inhibición del radical libre DPPH[•] mostró valores comprendidos entre 90,1 y 178,2 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$. Estos resultados fueron inferiores a los reportados por Córdova et al. (78), quienes evaluaron tres variedades (TAG, TA y TY) de semillas amargas de tarwi extraídas con metanol al 80%, obteniendo valores de 539, 528 y 509 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$,

respectivamente. No obstante, los valores obtenidos en este trabajo fueron superiores a los informados por Choquetico et al. (79), quienes analizaron dos variedades (TAG y TCF) de semillas desamargadas extraídas con etanol al 80%, reportando valores de 15 y 56 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$. De manera similar, los resultados del presente estudio fueron comparables e incluso superiores a los descritos por Ranilla et al. (30), quienes evaluaron la capacidad antioxidante del cotiledón de dos variedades (TA y TY) mediante extracción con metanol al 70%, obteniendo valores de 89 y 82 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$. Asimismo, los valores reportados en este trabajo superan los descritos por Estivi et al. (82), quienes informaron valores de 34, 50 y 86 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$ en semillas desamargadas de las especies *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus luteus*, respectivamente.

En cuanto a la FL y la FA, no se encontraron estudios previos que reporten la capacidad antioxidante del tarwi evaluada mediante el método DPPH^{*}. Sin embargo, Aliboudhar et al., (80) quienes evaluaron otras fuentes vegetales han descrito actividad antioxidante asociada a la FA, en un extracto alcaloide de semillas de *Ammodaucus foetida* reportaron un IC_{50} de 92,9 $\mu\text{g/mL}$, donde se identificaron compuestos como N-metilcisteína, lupanina y anagirina, lo que sugiere que los alcaloides podrían contribuir a la actividad antioxidante observada en matrices vegetales.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que las semillas de tarwi presentan una elevada capacidad antioxidante frente al radical ABTS^{*+} en las tres fracciones evaluadas. En particular, la FH mostró valores entre 12 608 y 15 283 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g b.s.}$, los cuales fueron comparables con los reportados por Córdova et al. (78), quienes analizaron semillas amargas extraídas con metanol al 80% de tres variedades (TAG, TA y TY), obteniendo niveles de 14 672, 15 620 y 14 739 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g b.s.}$, respectivamente. En contraste, Choquetico et al. (79) informaron valores considerablemente menores de 477 y 733 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g b.s.}$ en semillas desamargadas extraídas con etanol al 80% de las variedades TAG y TCF. De forma similar, Pascual et al. (81) reportaron 960 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g b.s.}$ en harina de la variedad TA desamargada y desengrasada extraída con metanol al 80% (correspondiente a la FH); cabe señalar que dicha harina fue previamente sometida a prensado tipo expeller, lo que podría influir en la reducción del contenido de compuestos antioxidantes. Adicionalmente, Estivi et al. (82) reportaron valores menores en semillas desamargadas de diferentes especies del género *Lupinus* (*L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*), con valores de 741, 923 y 3134

$\mu\text{mol ET}/100 \text{ g b.s.}$, respectivamente, lo que refleja la variabilidad de la capacidad antioxidante según la especie, tratamiento y método de extracción. Respecto a la FL, en el presente estudio se obtuvieron valores entre 545,3 y 663,2 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g b.s.}$ Estos resultados fueron inferiores a los reportados por Pascual et al. (81), quienes informaron 1181 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g b.s.}$ en harina de la variedad TA desamargada y desengrasada extraída con diclorometano a partir del pellet de la FH.

Hasta la fecha, no se han reportado estudios sobre la capacidad antioxidante de la FA del tarwi evaluada mediante el método de inhibición del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. En este sentido, el presente trabajo constituye el primer reporte que describe la capacidad antioxidante de la FA en extractos de cinco variedades de tarwi frente a este radical.

De lo presentado anteriormente, se destaca que el proceso de desamargado donde se eliminan los AQ de la semilla influye significativamente en los resultados de capacidad antioxidante, probablemente debido a la pérdida simultánea de compuestos bioactivos con potencial actividad antioxidante. Córdova et al (78) evaluó la capacidad antioxidante en muestras amargas y desamargadas de la variedad TAG mediante los dos métodos empleados en este estudio, así como su relación con el contenido de compuestos fenólicos totales. Sus resultados evidenciaron que el proceso de desamargado redujo la capacidad antioxidante, disminuyendo de 539 a 415 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ (método del DPPH $^{\bullet}$) y de 14 672 a 7 215 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ (método del $\text{ABTS}^{\bullet+}$). Esta reducción se correlaciona con el contenido de fenoles totales, el cual descendió de 133 a 103 mg equivalentes de ácido gálico (AGE)/100 g b.s. Asimismo, esta misma tendencia fue observada en las otras variedades evaluadas (TA y TY). En el proceso de desamargado las semillas de tarwi son sometidas a temperaturas altas, además de lavados extensos, pudiendo así degradar muchos compuestos bioactivos que son termolábiles, tales como compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles, etc facilitando su descomposición y oxidación (29).

Las diferencias observadas en la capacidad antioxidante de las fracciones evaluadas mediante ambos métodos pueden atribuirse a la naturaleza y concentración de los compuestos bioactivos presentes en cada extracto. Córdova et al (78) reportó contenidos de compuestos fenólicos totales en tres variedades de harina de tarwi (TAG, TA y TY), extraídas con metanol al 80% y sin proceso de desamargado, de 133, 135 y 142 mg equivalentes de ácido gálico (AGE)/100 g b.s., respectivamente. Entre los compuestos

fenólicos detectados en la FH del tarwi, destacan los flavonoides, cuyos contenidos reportados oscilan entre 187 y 252 mg/100 g b.s. Dentro de este grupo, las flavonas se encontraron en un rango de 34 a 47 mg/100 g b.s., mientras que las isoflavonas constituyeron el subgrupo predominante, con valores entre 153 y 202 mg/100 g b.s. (28). En cuanto a los compuestos de naturaleza más apolar que podrían estar contribuyendo a la capacidad antioxidante de la FL, se ha reportado en el tarwi un contenido de fitoesteroles totales entre 317 y 369 mg/100 g b.s. lo que podría sugerir una mayor contribución de los fitoesteroles a la capacidad antioxidante de esta fracción (79). Sin embargo, es necesario identificar la composición exacta de cada fracción evaluada en estudios futuros.

En otro estudio Pascual (81) evaluó compuestos bioactivos en el aceite obtenido por prensado tipo expeller y en las harinas residuales desamargadas y desengrasadas de tarwi variedad TA. Los autores observaron una mayor presencia de compuestos fenólicos en la harina 128,47 mg AGE/100 g en comparación con el aceite 7,04 mg AGE/100 g, lo cual se explica por la naturaleza predominantemente hidrofílica de los compuestos fenólicos. En contraste, el aceite presentó un contenido relevante de compuestos lipofílicos, con 570 mg/kg de tocoferoles totales y 99 930 mg/100 g de fitoesteroles totales, éstos últimos estarían contribuyendo a la capacidad antioxidante de la FL en el presente estudio. Los fitoesteroles, como el β -sitosterol, presentan actividad antioxidante al eliminar radicales peroxilo mediante mecanismos como transferencia de hidrógeno, además de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes y reducir especies reactivas de oxígeno (84)

Si se consideran los compuestos bioactivos presentes en la FA con potencial capacidad antioxidante, hasta la fecha solo se ha reportado un estudio que asocia esta actividad frente al radical DPPH[•] con AQ específicos del tarwi, como la lupanina y la anagirina (80). No obstante, existe amplia evidencia en la literatura que demuestra que otros tipos de alcaloides también pueden ejercer actividad antioxidante. Por ejemplo, Feng X et al (101). reportaron que diversos alcaloides isoquinolínicos presentan actividad antioxidante frente al radical DPPH[•], lo que evidencia que los metabolitos nitrogenados pueden participar en mecanismos de neutralización de especies reactivas. De manera similar, Zahari et al (102). informaron que extractos ricos en alcaloides bisbencilisoquinolínicos mostraron efecto antioxidante frente al radical DPPH[•], reforzando la hipótesis de que este grupo de compuestos puede contribuir al potencial

antioxidante de muestras vegetales. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que dichos metabolitos contribuyen de manera significativa a la actividad antioxidante detectada en las semillas de tarwi. No obstante, es necesario analizar la composición de alcaloides de la FA en estudios posteriores con el fin de confirmar la contribución de la FA a la capacidad antioxidante reportada en el presente estudio.

Si bien existen múltiples mecanismos asociados a la capacidad antioxidante de los compuestos naturales, el presente trabajo se enfocó específicamente en evaluar la capacidad de neutralización de radicales libres mediante mecanismos de transferencia electrónica y/o donación de hidrógeno, estabilizando especies reactivas de oxígeno (ROS) y deteniendo reacciones de peroxidación lipídica (53)(55), utilizando modelos químicos *in vitro* basados en radicales sintéticos como DPPH[•] y ABTS^{•+}. Estos ensayos permiten estimar la capacidad antioxidante primaria de los extractos y fracciones evaluadas, principalmente relacionada con la estabilización de especies radicalarias a través de reacciones redox directas.

Sin embargo, debe considerarse que la actividad antioxidante en sistemas biológicos es considerablemente más compleja que la observada en modelos químicos *in vitro*. En organismos vivos, los compuestos antioxidantes pueden actuar no solo mediante la captura directa de radicales libres, sino también a través de otros mecanismos, como la modulación de vías de señalización celular redox-sensibles (119), la activación de sistemas antioxidantes endógenos, por ejemplo, la vía Keap1-Nrf2/ARE (120), la inhibición de enzimas prooxidantes (121), entre otras.

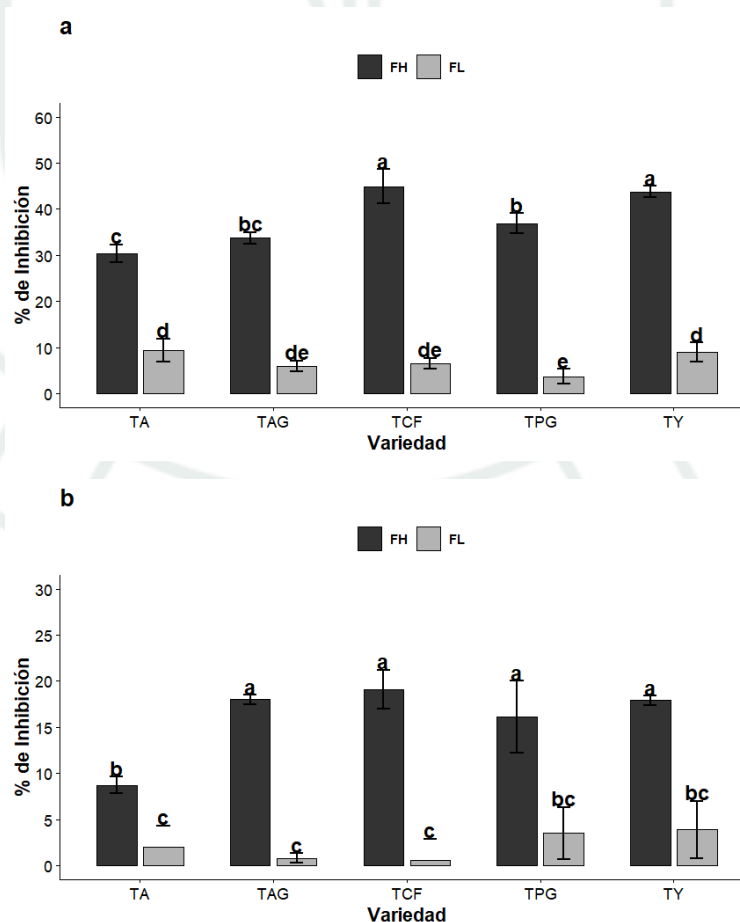
Por ello, los resultados obtenidos mediante los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+} no pueden extrapolarse directamente al comportamiento biológico *in vivo*, sino que deben interpretarse como una aproximación inicial al potencial antioxidante de las fracciones del tarwi. A pesar de estas limitaciones, los hallazgos del presente estudio constituyen una base importante para futuras investigaciones orientadas a profundizar en los mecanismos antioxidantes del tarwi mediante otros modelos.

3.2.Potencial antihiperglicémico de las fracciones hidrofílicas, lipofílicas y de la fracción alcaloide de las variedades comerciales de tarwi a través de la inhibición de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa

La (Figura 13) muestra la actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima α -glucosidasa evaluada en las fracciones hidrofílica (FH), lipofílica (FL) y alcaloide (FA) de cinco

variedades de semillas de tarwi amargo. El ensayo se realizó a tres dosis de muestra (10, 2 y 1,2 mg). En términos generales, la FH presentó una mayor capacidad inhibitoria en comparación con la FL. Asimismo, la inhibición de la α -glucosidasa por las fracciones FH y FL evidenció un comportamiento dosis-dependiente, es decir, el porcentaje de inhibición disminuyó conforme se redujo la concentración de la muestra. Como control positivo se empleó acarbosa, la cual presentó 85 % de inhibición en promedio a una concentración de 5 mg/mL (Anexo 7).

La FH mostró los mayores porcentajes de inhibición a la dosis de 10 mg de muestra, con valores entre 30 y 45 %. Entre las variedades, TCF destacó con porcentajes de inhibición de 45, 19 y 14 % a las dosis de 10, 2 y 1,2 mg, respectivamente, seguida de la variedad TY con valores 44, 18 y 13 %. La FL presentó una actividad inhibitoria considerablemente menor que la FH, con valores entre 4 y 9 %. Dentro de esta fracción, la variedad TA mostró la mayor respuesta 9 y 3 % a dosis de 10 y 2 mg de muestra, seguida de la variedad TY, con porcentajes de inhibición de 9, 4 y 2 % a las dosis de 10, 2 y 1,2 mg, respectivamente. En contraste, la FA no inhibió la α -glucosidasa en ninguna de las concentraciones evaluadas.



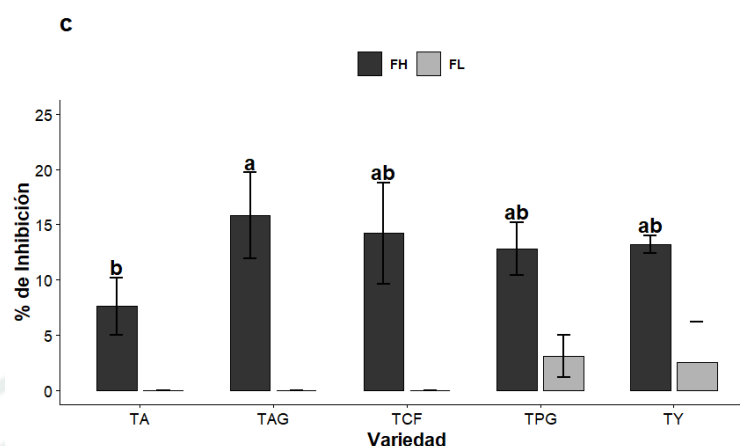


Figura 13. Porcentaje de inhibición in vitro de α -glucosidasa de las fracciones hidrofílica (FH) y lipofílica (FL) de variedades de tarwi evaluadas a diferentes dosis muestra: 10 mg (a), 2 mg (b) y 1,2 mg (c). Valores expresados como media $\pm$ desviación estándar (n = 4). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p < 0,05). Los resultados completos se presentan en el Anexo 8.

En relación con la inhibición de la enzima α -amilasa, la fracción FH presentó rangos muy bajos de inhibición de esta enzima, mientras que la FL no mostró actividad inhibitoria en este ensayo. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el caso de la inhibición de la α -glucosidasa, la FA mostró una alta actividad inhibitoria de la α -amilasa a las tres dosis de muestra evaluadas (50, 25 y 12,5 mg) (Figura 14) destacando la variedad TCF con porcentajes de inhibición de 78, 25 y 3 %. La acarbosa se utilizó también como control positivo del ensayo presentando un valor promedio de 85 % de inhibición de la α -amilasa a una concentración de 1 mg/mL (73) (Anexo 10).

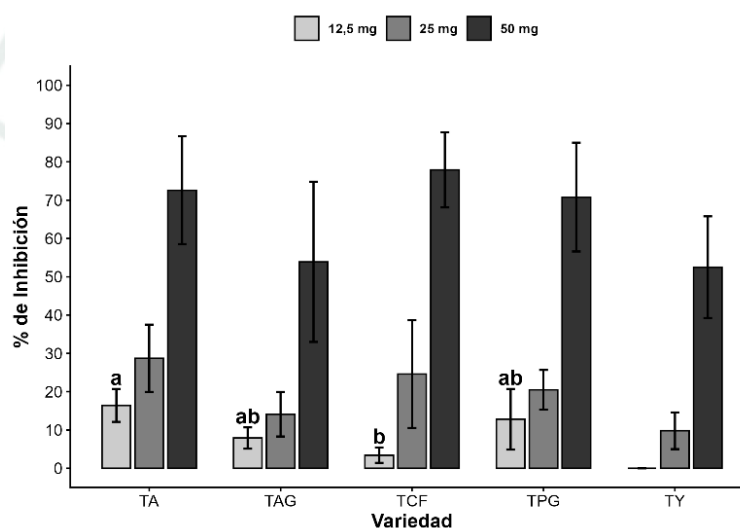


Figura 14. Porcentaje de inhibición in vitro de α -amilasa de la fracción alcaloide (FA) de variedades de tarwi a diferentes dosis muestra Valores expresados como media $\pm$ desviación estándar (n = 4). Letras diferentes dentro de cada barra indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p < 0,05). Barras sin letras indican que no hubo diferencia significativa a una misma dosis de muestra. Los resultados completos se presentan en el Anexo 11.

En el caso de la FH, solo las variedades TA, TAG y TPG mostraron actividad inhibitoria, con porcentajes de 11, 5 y 2 %, respectivamente, y únicamente a la dosis de 50 mg de muestra, lo que evidencia una baja capacidad inhibitoria de la α -amilasa de esta fracción. Por otro lado, la FL no presentó inhibición detectable en ninguna de las variedades evaluadas a la máxima dosis de muestra analizada.

En contraste, la FA mostró una clara inhibición dependiente de la dosis de muestra, observándose un incremento progresivo del porcentaje de inhibición conforme aumentó la dosis de la muestra. A 12,5 mg se registró una inhibición moderada de 3 y 16 %, donde predominó la variedad TA (16 %), seguida de la muestra TPG (11 %). A la concentración intermedia de 25 mg, la inhibición osciló entre 10 y 28 %, destacando las variedades TA (28 %) y TCF (25 %). Finalmente, a 50 mg se alcanzaron los mayores niveles de inhibición, con valores entre 53 y 78 %, siendo la variedad TCF (78 %) la de mayor actividad, seguida de TA (73 %).

Los estudios sobre la actividad antihiper glucémica a través del análisis de la inhibición de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa en *L. mutabilis* son muy escasos. Ranilla et al. (72) reportaron valores de actividad inhibitoria de la α -glucosidasa entre 19 % y 26 % a una cantidad de 5 mg de dos muestras de *Lupinus mutabilis*. Estos resultados son comparables con los obtenidos en el presente estudio, donde se registraron valores de inhibición del 19 % en la variedad TCF a 2 mg y del 30 % en la variedad TA a 10 mg. Según otros estudios realizados en otras especies del género *Lupinus*. Hellal et al. (88) (89) evaluaron la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa empleando dos extractos de semillas liofilizadas de *L. albus* (clorofórmico y etanólico), reportando valores de IC₅₀ 20,08 μ g/mL para el extracto clorofórmico y de IC₅₀ de 6,45 μ g/mL para el extracto etanólico, evidenciando mayor potencia inhibitoria del extracto etanólico. Esta tendencia fue similar a la observada en el presente estudio donde la FH tuvo una mayor inhibición de la α -glucosidasa que la FL. Sin embargo, Mazumder et al. (90) reportaron

valores de IC₅₀ considerablemente más altos para la inhibición de α -amilasa (4330,19 $\mu\text{g/mL}$) y α -glucosidasa (5174,46 $\mu\text{g/mL}$) en extractos metanólicos de semillas de *L. angustifolius* lo que sugiere una menor eficacia inhibitoria de estas muestras. Estas diferencias pueden atribuirse a diferencias en las especies evaluadas, al tipo de solvente empleado y al perfil fitoquímico de los extractos específico de cada fracción, factores que influyen de manera determinante en esta propiedad *in vitro*.

En un ensayo en pacientes con diabetes tipo 2, Baldeón et al. (87) evaluaron el efecto del consumo de tarwi cocido (desamargado, molido y encapsulado) y de sus alcaloides (dosis de 2.5 mg/kg peso corporal), encontrando que el tarwi cocido produjo una mayor reducción de la glucosa a los 90 minutos (14,25 %) frente al tratamiento con alcaloides (9,93 %), mientras que estos últimos se asociaron con una mayor disminución de insulina (4,21 %) comparado con el tratamiento con tarwi (2,56 %); además, ambos tratamientos redujeron la glucosa sin efectos adversos reportados.

En cuanto a la FA, esta investigación muestra por primera vez que la fracción alcaloide del tarwi peruano presenta una alta inhibición de la α -amilasa. Algunos estudios a nivel *in vitro* e *in vivo* han asociado a ciertos AQ aislados con un potencial antihiper glucémico. Garcia et al (13), observaron que la 13-hidroxilupanina y 17-oxolupanina ejercieron un efecto secretagogo de insulina en islotes pancreáticos de ratas. Paolisso et al (91), demostraron que la esparteína también tendría un efecto secretagogo de la insulina. Wiedemann et al (92) en un ensayo *in vivo* demostró que la administración de 0,5 mmol/L de lupanina estimulaba la secreción de insulina. Estos estudios coinciden en señalar a la esparteína como a la lupanina como secretagogos, considerándolos como compuestos útiles para el tratamiento de apoyo de la diabetes tipo 2, aunque son necesarios más estudios *in vivo* para confirmar esto.

Las diferencias estructurales entre la α -amilasa y la α -glucosidasa podrían explicar la inhibición selectiva observada por los alcaloides quinolizidínicos. La α -amilasa pertenece a la familia GH13 (Glycoside Hydrolase Family 13) y presenta un sitio activo amplio y abierto, con varios subsitios capaces de acomodar moléculas voluminosas y polisacáridos como el almidón (115). En cambio, la α -glucosidasa, perteneciente principalmente a la familia GH31 (Glycoside Hydrolase Family 31), posee un bolsillo catalítico más pequeño y restringido, adaptado para oligosacáridos de bajo peso molecular (116). Debido a su estructura bicíclica rígida y voluminosa (41) los alcaloides

quinolizidínicos podrían interactuar con mayor facilidad en la hendidura catalítica de la α -amilasa, mientras que experimentarían impedimento estérico en el sitio activo más compacto de la α -glucosidasa. Estas diferencias topográficas y conformacionales entre ambas enzimas podrían ser determinantes en la especificidad inhibitoria observada.

Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales que permitan confirmar el mecanismo de acción y la selectividad de la fracción alcaloide frente a la α -amilasa. En este contexto, análisis de acoplamiento molecular, estudios cinéticos enzimáticos y evaluaciones estructurales podrían aportar mayor evidencia sobre las interacciones específicas entre los AQ y los residuos catalíticos de la enzima.

En relación a los compuestos posiblemente asociados a estas propiedades, es posible que diversos compuestos bioactivos presentes en la FH del tarwi, particularmente los compuestos fenólicos descritos en el punto 3.1 (Capítulo III), estarían contribuyendo con la inhibición de la α -glucosidasa. Los compuestos fenólicos se han encontrado en concentraciones de 133 a 142 mg (AGE)/100 g b.s. en las semillas de tarwi amargas (78). Dentro de este grupo, se han identificado flavonoides, destacando particularmente la presencia de isoflavonas (28)(30).

Estos metabolitos exhiben actividad inhibitoria sobre enzimas digestivas clave, como la α -amilasa y la α -glucosidasa, responsables de la hidrólisis de carbohidratos complejos y de la liberación de glucosa en el torrente sanguíneo. Diversos estudios respaldan este efecto. Por ejemplo, se ha demostrado que derivados de isoflavonas presentan actividad inhibitoria frente a ambas enzimas, con valores de IC_{50} que oscilan entre 18 y 392 μ M para la α -glucosidasa y entre 21 y 143 μ M para la α -amilasa (31). Asimismo, se ha reportado que compuestos fenólicos específicos, como el ácido gálico y la quercetina, inhiben significativamente la α -glucosidasa, con valores de IC_{50} de 26 y 0,85 μ g/mL, respectivamente (93)

Asimismo, no solo los compuestos fenólicos podrían contribuir a esta bioactividad. Diversos metabolitos no fenólicos encontrados en menores concentraciones que los compuestos fenólicos, también han sido identificados en el tarwi y podrían desempeñar un papel relevante. Brandolini et al. (40) identificaron carotenoides del tipo luteína (92,6 %) y zeaxantina (7,37 %) en tres variedades de tarwi (TAG, TA y TY), reportando contenidos de carotenoides totales de 1,17 mg/kg, 1,29 mg/kg y 1,48 mg/kg, respectivamente. Asimismo, Berru et al. (38) informaron un contenido total de

carotenoides de 1,61 mg/kg en 33 variedades de *Lupinus mutabilis* del tipo leutina, ($\alpha + \beta$)-caroteno, zeaxantina y β -criptoxantina. Se ha reportado que algunos carotenoides como la leuteína (108), β -caroteno, neoxantina, criptoxantina, violaxantina etc, podrían contribuir en la capacidad de inhibición de las enzimas como la α -amilasa y la α -glucosidasa (112)(113). Otros compuestos no fenólicos como los tocoferoles y fitosteroles, también identificados en tarwi (37)(40), se han asociado a propiedades antihiperglucémicas (114). Es posible que estos compuestos menos polares estén asociados a la baja actividad de inhibición de la α -glucosidasa observada en la FL de las variedades de tarwi evaluadas. Por lo tanto, el análisis de cada fracción en estudios a futuro permitiría identificar los compuestos relacionados con esta propiedad.

Desde el punto de vista farmacológico, la mayor inhibición de la FH sobre la enzima α -glucosidasa en relación a la acción sobre la α -amilasa podría representar una ventaja terapéutica importante, ya que permitiría modular la digestión y absorción de carbohidratos, contribuyendo a disminuir los picos de glucosa posprandial asociados con la diabetes mellitus tipo 2, sin generar una inhibición excesiva de α -amilasa intestinal. Diversos fármacos antidiabéticos, como la acarbosa son ampliamente utilizados para inhibir enzimas digestivas del almidón (47); sin embargo, este compuesto actúa de manera poco selectiva sobre α -amilasa y α -glucosidasa, ocasionando una digestión incompleta de los carbohidratos (117). Como consecuencia, una mayor cantidad de carbohidratos no digeridos alcanza el colon, donde son fermentados por el microbiota intestinal, provocando efectos adversos gastrointestinales como flatulencia, distensión abdominal y diarrea (118).

La identificación de compuestos naturales con capacidad de inhibir preferentemente la α -glucosidasa y presentar una baja actividad inhibitoria frente a α -amilasa podría constituir una alternativa terapéutica o nutracéutica prometedora, al favorecer el control glucémico posprandial con una menor incidencia de efectos secundarios gastrointestinales.

Aunque la acarbosa usada como estándar inhibidor antihiperglicémico (47) presentó una alta inhibición de ambas enzimas digestivas a muy baja dosis, esta evidencia *in vitro* sugiere que el consumo de tarwi en conjunto con otros granos y fuentes de inhibidores de glucosidasas como parte de una dieta equilibrada podría constituir una estrategia nutricional natural para la prevención o el control de la hiperglicemia. Sin embargo, es

necesario proseguir con estudios para evaluar el impacto del procesamiento del tarwi como el desamargado, la cocción entre otros sobre estas propiedades, además de estudios *in vivo* que permitan confirmar la eficacia biológica observada *in vitro* y validar su aplicabilidad clínica.

Diversas normativas internacionales establecen límites máximos en función de criterios preventivos más que de una ingesta diaria tolerable formalmente definida para el consumo de AQ. La legislación del código alimentario de Australia y Nueva Zelanda fija un máximo de 200 mg/kg de alcaloides totales en semillas o harina de lupino destinadas a consumo humano (94) valor coincidente con el establecido por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) para grano de chocho desamargado (95). En contraste, regulaciones recientes de la Unión Europea proponen límites más restrictivos, en el rango de 35–50 mg/kg, reflejando un enfoque de mayor precaución (103). Por otro lado, la Autoridad Alimentaria de Australia y Nueva Zelanda recomienda una ingesta diaria tolerable provisional en humanos de 0.035 mg de alcaloides/kg de peso corporal (109). Considerando una persona adulta promedio de 70 kg de peso corporal, este límite equivaldría aproximadamente a una ingesta máxima tolerable de 2,45 mg de alcaloides por día. Una cantidad de 50 mg de muestra de harina de la variedad TCF presentó un 78% de inhibición de la enzima α -amilasa, evidenciando la más alta actividad biológica *in vitro* presentadas en las cinco variedades evaluadas. De acuerdo con lo reportado por Cortés et al. (110), esta variedad presenta un contenido estimado de 5,45% de alcaloides totales, lo que corresponde a una cantidad aproximada de 2,72 mg de alcaloides en 50 mg de muestra evaluada. Al comparar este valor con la ingesta diaria tolerable provisional propuesta por la Autoridad Alimentaria de Australia y Nueva Zelanda (109), se tendría un máximo de consumo de 2,45 mg de alcaloides/día para un adulto de 70 kg. La cantidad estimada de AQ presentes en el tarwi evaluado en el presente estudio se encontraría en un valor cercano al límite establecido, lo que sugiere la necesidad de una evaluación cuidadosa de su consumo. Sin embargo, Baldeón et al. (87) administraron una dosis de alcaloides de 2,5 mg/kg de peso corporal, sin observar efectos adversos en pacientes con diabetes tipo 2 durante un ensayo clínico de fase II.

No obstante, es importante destacar que la estimación presentada previamente se ha basado en cálculos teóricos y en datos de referencia. Se recomienda que futuros estudios incluyan análisis más detallados del perfil de AQ, así como ensayos biológicos y

toxicológicos, con el fin de validar la seguridad del consumo y garantizar la seguridad alimentaria de los productos derivados de tarwi.

3.3.Potencial antiobesidad de las fracciones hidrofílicas, lipofílicas y alcaloide de las variedades comerciales de tarwi a través de la inhibición de la enzima lipasa pancreática

El potencial antiobesidad de las FH, FL y FA de las muestras de tarwi se evaluó a través de la determinación de su capacidad inhibitoria de la enzima lipasa pancreática, cuya función es la digestión de los triglicéridos de la dieta, en monoglicéridos y ácidos grasos libres en el intestino delgado (63). Para ello se utilizó un ensayo fluorimétrico (74). Como control positivo se utilizó orlistat, un inhibidor conocido de la lipasa pancreática (64). Este compuesto presentó una inhibición promedio aproximada del 30 % a una concentración de 10 μ M y del 40 % a 200 μ M, lo que evidenció una respuesta inhibitoria dependiente de la concentración del inhibidor estándar, aunque no siguió una tendencia lineal.

Al evaluar las fracciones FH, FL y FA del tarwi, se observó que al realizar diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:500) o mayores, los porcentajes de inhibición no mostraron variaciones significativas, es decir no se observó una dosis dependencia. debido a la posible presencia de compuestos con fluorescencia propia, se evaluó incorporar un blanco por muestra con el fin de eliminar alguna interferencia presente en la propia muestra. Sin embargo, la fluorescencia del blanco fue similar a la emitida por las muestras, obteniéndose valores aparentes de inhibición cercanos al 90 %. tras aplicar diluciones mayores adicionales, los porcentajes de inhibición no disminuyeron de manera proporcional, es decir, no se observó una dosis dependencia.

Por lo anterior, se procedió a evaluar la actividad inhibitoria de compuestos puros posiblemente presentes en las fracciones evaluadas. Se seleccionó la FA, debido a que según Frick et al (75), los tipos de alcaloides más importantes presentes en el tarwi son la lupanina y esparteína, y también debido a la disponibilidad de los mismos. En la Tabla 10 se presenta el porcentaje de inhibición de la lipasa por estos dos alcaloides a 3 concentraciones diferentes. Ambos compuestos presentaron porcentajes de inhibición similares en las diferentes concentraciones evaluadas (0,25; 2,5 y 25 ppm), sin evidenciar una variación significativa en función de la dosis, a pesar que las concentraciones de estos compuestos aumentaron en un rango de 10.

Tabla 6. Actividad inhibitoria *in vitro* de los estándares esparteína y lupanina (% inhibición)

	0,25 ppm	2,5 ppm	25 ppm
Esparteína	40,30 ± 0,2	39,60 ± 1,1	39,43 ± 1,4
Lupanina	37,62 ± 2,6	37,51 ± 2,5	37,26 ± 2,1

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición entre las concentraciones evaluadas ($p > 0.05$).

En particular, la esparteína mostró valores de inhibición entre 39,43 % y 40,30 %, mientras que la lupanina presentó porcentajes entre 37,26 % y 37,62 %. Esta tendencia demuestra la ausencia de una relación dosis–respuesta, similar a lo observado en las fracciones FH, FL y FA.

En función a los resultados obtenidos se puede indicar que la inhibición de la lipasa sería aparente y no se debería exclusivamente a una interacción inhibitoria real con la enzima lipasa pancreática, sino que podría estar influenciada por interferencias asociadas a propiedades ópticas de los compuestos evaluados, como fluorescencia intrínseca natural de los compuestos bioactivos presentes en las fracciones analizadas, lo cual limita la interpretación de los resultados obtenidos mediante el método fluorimétrico empleado.

Una posible explicación se relacionaría con las propiedades ópticas de los metabolitos presentes en las fracciones evaluadas. Diversos compuestos bioactivos de origen vegetal poseen fluorescencia intrínseca natural, lo que puede alterar significativamente la señal en métodos fluorimétricos como se resume en la (Tabla 7).

Tabla 7. Fluorescencia de algunos compuestos bioactivos

Compuestos	Máximos de excitación(nm)	Máximos de emisión (nm)	Referencia
Compuestos fenólicos			
Ácido ferúlico	260	420	(104)
Ácido cafeico	260	425	

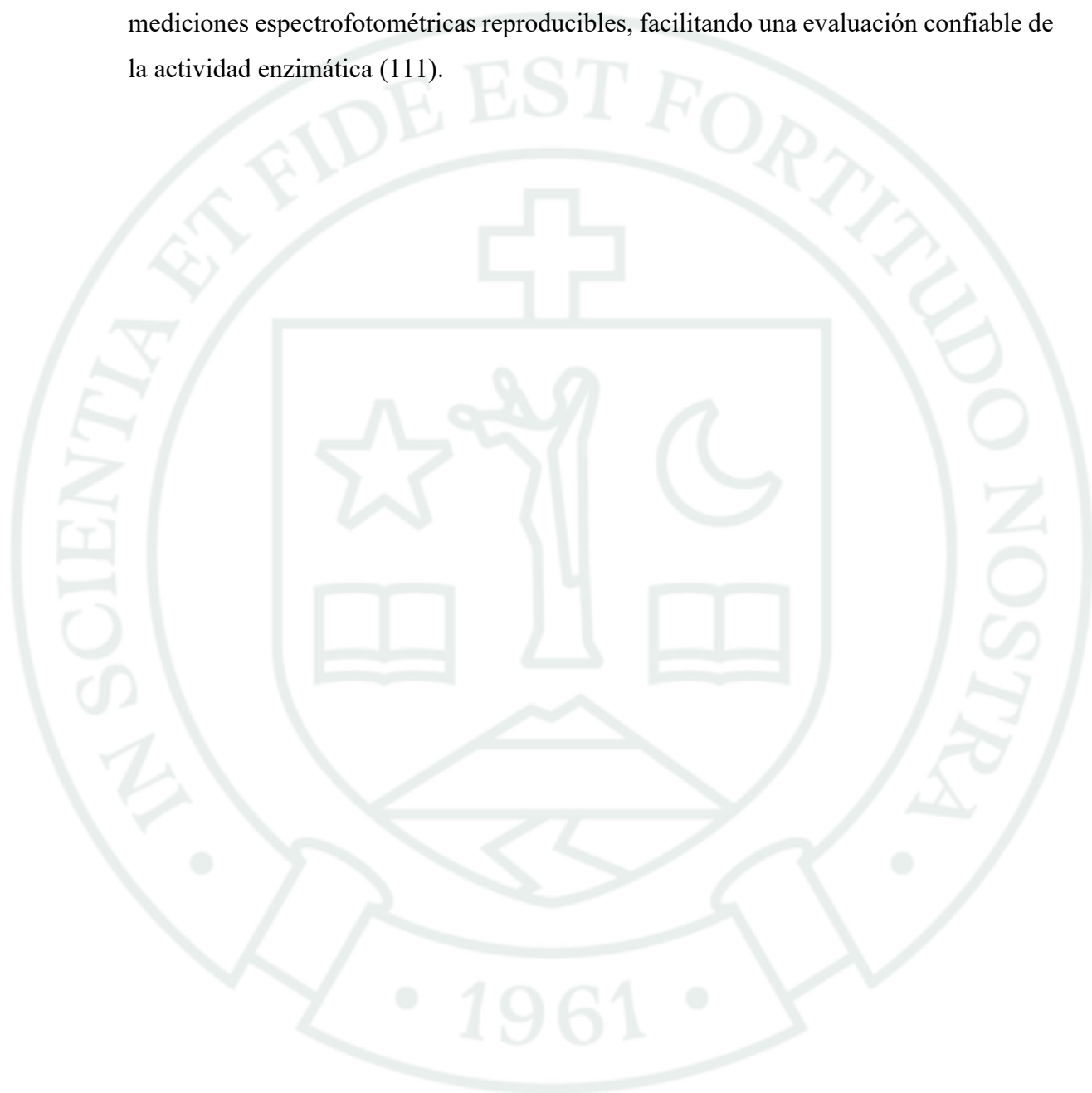
Catequina, epicatequina y ácido vanílico	278	260	
Flavonoides	365-390	450-520	(105)
Carotenoides	450-480	525-580	(104)
Tocoferoles	295	325	(106)

La interferencia de metabolitos bioactivos en ensayos fluorimétricos ha sido demostrada experimentalmente por Zou et al. (107), quienes evaluaron 25 compuestos naturales en ensayos de inhibición enzimática basados en productos fluorogénicos (excitación 390–409 nm; emisión 460–530 nm). Compuestos incluyendo flavonoides como quercetina, presentaron fluorescencia intrínseca o quenching suficiente para alterar significativamente la señal del metabolito fluorescente, donde produjeron una señal intrínseca hasta 424% mayor que la del producto del ensayo, generando potenciales falsos negativos. Asimismo, LA quercetina indujo disminuciones artificiales de hasta 55% en la señal fluorescente, lo que podría interpretarse erróneamente como inhibición débil. Estos hallazgos evidencian que la fluorescencia intrínseca y el quenching constituyen variables de confusión críticas en la evaluación fluorimétrica de productos naturales.

En este contexto, la ausencia de relación dosis–respuesta observada para esparteína y lupanina, sumada a la evidencia reportada en la literatura sobre interferencias ópticas en ensayos fluorimétricos, sugiere que los resultados obtenidos deben interpretarse con cautela. Es probable que la señal registrada no refleje exclusivamente actividad inhibitoria real sobre la lipasa pancreática, sino que esté influenciada por fenómenos de fluorescencia intrínseca, lo cual constituye una limitación metodológica del sistema analítico empleado. En el ensayo aplicado, las longitudes de onda de excitación y 20emisión usadas fueron de 360 y 460 nm, respectivamente. Estos valores coinciden con los valores presentados en la (Tabla 7).

En consecuencia, sería necesario probar con otros métodos alternativos no fluorimétricos. existe un método donde se utiliza El p-nitrofenil palmitato (pNPP) como sustrato cromogénico y podría ser una alternativa metodológica válida, robusta y

accesible para la evaluación de la actividad de la lipasa pancreática (111). En este sentido, un estudio previo ha demostrado que la velocidad de hidrólisis de este sustrato puede ser controlada y optimizada mediante el ajuste de condiciones experimentales clave, tales como el tipo de emulsionante, el pH del medio, la composición del tampón y la presencia de aditivos. Bajo estas condiciones, el empleo de pNPP permitiría obtener mediciones espectrofotométricas reproducibles, facilitando una evaluación confiable de la actividad enzimática (111).



4. CONCLUSIONES

- La fracción hidrofílica de las cinco variedades comerciales de tarwi presentó una mayor capacidad antioxidante *in vitro* con los métodos de inhibición de los radicales libres DPPH[•] y ABTS^{•+} respecto a la fracción lipofílica, y las variedades TA y TAG mostraron los valores más altos con ambos métodos, aunque la respuesta fue superior con el método de inhibición del ABTS^{•+} (13974 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$ y 15282 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$). La fracción alcaloide tuvo un aporte significativo a la capacidad antioxidante total (73 %) cuando se aplicó el método de inhibición del radical ABTS^{•+}.
- El potencial antihiperglicémico *in vitro* por el método de inhibición de la enzima α -glucosidasa fue mayor en la fracción hidrofílica en comparación con las fracciones lipofílica y alcaloide en todas las variedades comerciales de tarwi analizadas, destacando las variedades TCF y TY (44,9 % y 43,8 % con 10 mg dosis de la muestra, respectivamente). La fracción alcaloide mostró la mayor actividad inhibitoria sobre la α -amilasa, siendo la variedad TCF la que presentó el mayor porcentaje de inhibición (78 % a 50 mg dosis de la muestra).
- El potencial antiobesidad *in vitro* evaluado a través de la inhibición de la enzima lipasa pancreática mediante un método fluorimétrico en las fracciones hidrofílica, lipofílica y la fracción alcaloidea de las variedades de tarwi evidenció interferencias asociadas a la fluorescencia intrínseca de los metabolitos presentes en las muestras. Esta interferencia se reflejó en la ausencia de una relación dosis–respuesta tanto en las fracciones analizadas como en los alcaloides esparteína y lupanina (metabolitos presentes en la fracción alcaloide del tarwi), por lo que esta propiedad debería ser evaluada con un método no fluorimétrico.

5. RECOMENDACIONES

- Los ensayos *in vitro* utilizados para evaluar la capacidad antioxidante mediante los métodos de inhibición de los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•] constituyen aproximaciones preliminares, por lo que se recomienda complementar estos resultados con estudios *in vivo* que permitan confirmar su efecto biológico en sistemas más complejos.
- La determinación *in vitro* de la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa permite estimar el posible efecto hipoglucemiante de las fracciones estudiadas; sin embargo, se recomienda validar estos resultados mediante modelos *in vivo* que consideren procesos fisiológicos como digestión, absorción y metabolismo.
- Debido a que algunos metabolitos de origen vegetal pueden presentar fluorescencia intrínseca o generar interferencias durante las mediciones fluorimétricas, se recomienda complementar la evaluación de la inhibición de lipasa pancreática con métodos no fluorimétricos, como ensayos colorimétricos, (por ejemplo, 4-nitrofenil palmitato u otros sustratos equivalentes) a fin de confirmar la actividad inhibitoria observada.
- Se recomienda realizar análisis cualitativos y cuantitativos de los compuestos bioactivos presentes en cada fracción obtenida (hidrofílica, lipofílica y alcaloídica), mediante técnicas analíticas como HPLC, LC-MS o GC-MS, con el objetivo de identificar los metabolitos responsables de las actividades biológicas observadas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ONU. Las enfermedades no transmisibles causan el 75% de las muertes globales y van en aumento. Noticias ONU [Internet].2023. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2023/05/1521192>.
2. Campss J, García-Heredia A. Introduction: Oxidation and Inflammation, A Molecular Link Between Non-Communicable Diseases. *Advances in Experimental Medicina and Biology* .2014; 824:1–4.
3. CDC Perú: Actualización en vigilancia de diabetes. CDC MINSA [Internet]. 2024. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2024/SE242024/03.pdf>
4. Hamza N, Berke B, Umar A, Cheze C, Gin H, Moore N. A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*.2019;238:111841.
5. Lang Y, Gao N, Zang Z, Meng X, Lin Y, Yang S, et al. Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. *Journal of Future Foods*. Beijing Academy of Food Sciences.2024;4:193–204.
6. Sukhikh S, Babich O, Prosekov A, Kalashnikova O, Noskova S, Bakhtiyarova A, et al. Antidiabetic Properties of Plant Secondary Metabolites., *Metabolites*. 2023;13(4):513.
7. Luiza Koop B, Nascimento da Silva M, Diniz da Silva F, Thayres dos Santos Lima K, Santos Soares L, José de Andrade C, et al. Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: Sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. *Food Research International* (Ottawa, Ont). 2022;153:110929.

8. Rodríguez-Ortega D, Zambrano JL, Pereira-Lorenzo S, Torres A, Murillo Á. *Lupinus a* Breeding in the Andes of Ecuador, Peru, and Bolivia: A Review. *Agronomy. Multidisciplinary Digital Publishing Institute* 2024;14(1):94.
9. Fornasini M, Castro J, Villacres E, Narvaez L, Villamar MP, Baldeon ME. Efecto hipoglicemiante de *Lupinus mutabilis* en voluntarios sanos y sujetos con disglucemia. *Nutrición Hospitalaria*. 2012;27(2):425–33.
10. Khan MK, Karnpanit W, Nasar-Abbas SM, Huma Z e., Jayasena V. Phytochemical composition and bioactivities of lupin: A review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2015;50:2004–12.
11. Chirinos R, Cerna E, Pedreschi R, Calsin M, Aguilar-Galvez A, Campos D. Multifunctional *in vitro* bioactive properties: Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive of protein hydrolyzates from tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtained by enzymatic biotransformation. *Cereal Chemistry*. 2021;1;98(2):423–33.
12. Chirinos R, Pedreschi R, Rogez H, Larondelle Y, Campos D. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*. 2013; 1(5);47:145–52.
13. García López PM, De La Mora PG, Wysocka W, Maiztegui B, Alzugaray ME, Del Zotto H, et al. Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology*. 2004;504(1–2):139–42.
14. Chalampunte-FD, Tapia C, Sørensen M, Tapia B C, Sørensen M. The Andean Lupine- 'El Chocho' or "Tarwi" (*Lupinus Mutabilis* Sweet) General Observations on the Culture of Lupine. (*Lupinus Mutabilis* Sweet). *Biodiversity online journal*. 2021;1(4):000520.
15. Atchison GW, Nevado B, Eastwood RJ, Contreras-Ortiz N, Reynel C, Madriñán S, et al. Lost crops of the incas: Origins of domestication of the Andean pulse crop Tarwi, *Lupinus mutabilis*. *American Journal of Botany*. 2016;103:1592–606.

16. Suca GR, Suca GR, suca CA. Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) como futura fuente proteínica y avances de su desarrollo agroindustrial. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química. 2015;18(2):55–71.
17. Mario Edgar Tapia Núñez. EL TARWI, LUPINO ANDINO Tarwi, Tauri o Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). 2015;Primera Edición.
18. Villanueva MC. 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.
19. De la cruz N. “Caracterización fenotípica y de rendimiento preliminar de ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet), bajo condiciones del Callejón de Huaylas-Ancash” [Lima, Perú] Universidad Nacional Agraria La Molina; 2018.
20. Chirinos Arinas MC. Vista de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) una planta con potencial nutritivo y medicinal. Revista Bio Ciencias. 2015; 3(3): 163-172.
21. Camila Andre Rayos Flores 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.
22. Producción y comercio del tarhui. Minagri 2024. Disponible en: <https://repositorio.midagri.gob.pe/bitstream/20.500.13036/1398/1/Producci%C3%B3n%20y%20comercio%20del%20Tarhui.pdf>
23. Jacobsen SE, Mujica A. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales 2006: 458-482.
24. Carvajal-Larenas FE, Linnemann AR, Nout MJR, Koziol M, van Boekel MAJS. *Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Taylor and Francis Inc.; 2016;56:1454–87.

25. Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. 2019;33–50.
26. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*. 2012;27(1):76–89.
27. urukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114:1752–61.
28. Tian Y, Cortés-Avendaño P, Yang B, Glorio-Paulet P, Repo-Carrasco-Valencia R, Suomela JP. Flavonoid diversity in bitter and debittered seeds of Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Food Chemistry*. 2024; 442:138411.
29. Villacrés E, Quelal MB, Fernández E, García G, Cueva G, Rosell CM. Impact of debittering and fermentation processes on the antinutritional and antioxidant compounds in *Lupinus mutabilis* sweet. *Food Science and Technology*. 2020;131:109745.
30. Ranilla LG, Genovese MI, Lajolo FM. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009;22:397–404.
31. Hernández-Gutiérrez B, Cruz-López MC, Gómez-García O, Becerra-Martínez E, Jiménez-Montejo FE, Mendieta-Moctezuma A. Alpha-glucosidase and Alpha-amylase Inhibitors Derived from Naturally Occurring Prenylated Isoflavones. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2024;68(1):156–69.
32. Woodside J V., McGrath AJ, Lyner N, McKinley MC. Carotenoids and health in older people. *Maturitas*. 2015;80(1):63–8.

33. Weber D, Grune T. Carotenoid basics: from food to skin. *Redox Experimental Medicine*. 2023;23:0019.
34. Rivera-Madrid R, Carballo-Uicab VM, Cárdenas-Conejo Y, Aguilar-Espinosa M, Siva R. Overview of carotenoids and beneficial effects on human health. *Carotenoids: Properties, Processing and Applications*. 2020;1–40.
35. Phan MAT, Bucknall M, Arcot J. Interactive effects of β -carotene and anthocyanins on cellular uptake, antioxidant activity and anti-inflammatory activity *in vitro* and *ex vivo*. *Journal of Functional Foods*. 2018;45:129–37.
36. Wang J, Ma W, Ma W, Fang Z, Jiang Y, Jiang W, et al. Strategies for the efficient biosynthesis of β -carotene through microbial fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Science and Business Media. 2024;40(5);160.
37. Czubinski J, Grygier A, Siger A. *Lupinus mutabilis* seed composition and its comparison with other lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2021;99:103875.
38. Berru LB, Glorio-Paulet P, Basso C, Scarafoni A, Camarena F, Hidalgo A, et al. Chemical Composition, Tocopherol and Carotenoid Content of Seeds from Different Andean Lupin (*Lupinus mutabilis*) Ecotypes. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2021;76:98–104.
39. Järvinen R, Erkkilä AT. Tocopherols: Physiology and Health Effects. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016 303–8.
40. 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. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2022;106:104335.

41. Cely-Veloza W, Kato MJ, Coy-Barrera E. Quinolizidine-Type Alkaloids: Chemodiversity, Occurrence, and Bioactivity. ACS Omega. American Chemical Society; 2023;8:27862–93.
42. Villalpando-Vargas FV, Medina-Ceja LG, Rodríguez-Mercado S, Ventura-Mejía C. Esparteína y Lupanina como fitoterapias anticonvulsivas alternativas. e-CUCBA. 2019;8–17.
43. Daverio M, Cavicchiolo ME, Grotto P, Lonati D, Cananzi M, Da Dalt L. Bitter lupine beans ingestion in a child: a disregarded cause of acute anticholinergic toxicity. European Journal of Pediatrics. 2014;173:1549–51.
44. Jansen G, Jürgens HU, Ordon F. Effects of temperature on the alkaloid content of s of *lupinus angustifolius* cultivars. Journal of Agronomy and Crop Science. 2009;195:172–7.
45. Cely-Veloza W, Kato MJ, Coy-Barrera E. Quinolizidine-Type Alkaloids: Chemodiversity, Occurrence, and Bioactivity. ACS Omega. 2023;8:27862–93.
46. McLellan KCP, Barbalho SM, Cattalini M, Lerario AC. Type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and change in lifestyle. Revista de Nutricao. Revista de Nutricao. 2007;20:515–24.
47. García Soidán FJ, Riveiro Villanueva J. treatment of type 2 diabetes mellitus. Aten Primaria. 2024;57:103143.
48. Van De Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, Van De Lisdonk EH, Rutten GE, Van Weel C. α -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: Results from a Cochrane systematic review and meta-analysis., Diabetes Care. 2005;28:154–63.
49. Patil P, Mandal S, Tomar SK, Anand S. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. European Journal of Nutrition. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. 2015;54:863–80.

50. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*. 2012;70:257–65.
51. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 2010;4:118–26.
52. Ortiz Escarza JM, Medina López ME. Estrés oxidativo ¿un asesino silencioso? *Educación Química*. 2020;31:2.
53. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. [Internet]. 2006
54. Constanza L, María M, Ariza M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. 2012;10(18):213–25.
55. Fernández J, Da Silva M, Grigolett, Túnez-Fiñana. Estrés oxidativo inducido por el ejercicio | *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*. 2009:19–34.
56. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson s.r.l 2021;209:112891.
57. Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society symposium*. 1995;61:73–101.
58. Velasquez M., Gomez B., & Contreras R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75: 36–43.
59. Toolsee NA, Aruoma OI, Gunness TK, Kowlessur S, Dambala V, Murad F, et al. Effectiveness of Green Tea in a Randomized Human Cohort: Relevance to Diabetes and Its Complications. *Biomed Research International*. 2013;2013(1):412379.

60. Ciocoiu M, Badescu M, Badulescu O, Badescu L. The beneficial effects on blood pressure, dyslipidemia and oxidative stress of Sambucus nigra extract associated with renin inhibitors. *Pharmaceutical Biology*. 2016;54:3063–7.
61. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obesity Reviews*. 2017;18(7):715–23.
62. Obesidad y sobrepeso. WHO. [Internet]: May 2025 Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
63. Lowet ME. The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res*. 2002 43(12):2007–16.
64. Katherine B, Clavijo R, Angélica M, Celis C, Marcela J, Gama M. Inhibidores de la lipasa pancreática como alternativa de tratamiento frente a la obesidad. *Medicina e Investigación Universidad Autónoma del Estado de México* 2019;7(2):17–24.
65. Valdelamar L, Rodríguez M, Bermúdez V, Leal E, Bermúdez F, Cabrera M, et al. Tratamiento farmacológico de la obesidad: presente, pasado y futuro. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2007;26(1):10–20.
66. Zhu J, Hu M, Liang Y, Zhong M, Chen Z, Wang Z, et al. Pharmacovigilance analysis of orlistat adverse events based on the FDA adverse event reporting system (FAERS) database. *Heliyon*. 2024;10(14):e34837.
67. Martinez-Gonzalez AI, Alvarez-Parrilla E, Díaz-Sánchez ÁG, de la Rosa LA, Núñez-Gastélum JA, Vazquez-Flores AA, et al. *In vitro* Inhibition of Pancreatic Lipase by Polyphenols: ¹H NMR Kinetic, Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking Study. *Food Technol Biotechnol*. 2017;55(4):519.
68. Fuentealba C, Gálvez L, Cobos A, Olaeta JA, Defilippi BG, Chirinos R, et al. Characterization of main primary and secondary metabolites and *in vitro* antioxidant and antihyperglycemic properties in the mesocarp of three biotypes of *Pouteria lucuma*. *Food Chemistry*. 2016 ;190:403–11

69. Muzquiz M. ALKALOIDS | Gas Chromatography. In: Encyclopedia of Separation Science. Elsevier; 2000:1938–49.
70. Maurício Duarte-Almeida J, Novoa AV, Linares AF, Lajolo FM, Inés Genovese M. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2006 ;61:187–92.
71. Maltase - Worthington Enzyme Manual | Worthington Biochemical [Internet].1993. Disponible en: <https://www.worthington-biochem.com/products/maltase/manual>
72. Ranilla LG, Apostolidis E, Genovese MI, Lajolo FM, Shetty K. Evaluation of indigenous grains from the Peruvian Andean region for antidiabetes and antihypertension potential using *in vitro* methods. *Journal of Medicinal Food*. 2009 ;12(4):704–13.
73. Amylase, Alpha - Assay | Worthington Biochemical [Internet].1993. Disponible en: <https://www.worthington-biochem.com/products/amylase-alpha/assay>.
74. Nakai M., Fukui Y., Asami, S., Toyoda-Ono Y., Iwashita T., Shibata H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F. y Kiso. . Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2005; 53:4593-4598
75. Frick KM, Kamphuis LG, Siddique KHM, Singh KB, Foley RC. Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. *Frontiers in Plant Science*. *Frontiers Media S.A.*2017;8:87
76. Jiang C, Dong Z, Meng Z. Artificial preparation, biosynthetic, health effects, and applications of phytosterol and phytosterol ester: A review. *Food Bioscience*. 2024;59:104023.
77. Khallouki F, Zennouhi W, Hajji L, Bourhia M, Benbacer L, El Bouhali B, et al. Current advances in phytosterol free forms and esters: Classification, biosynthesis, chemistry, and detection. *Steroids*. 2024;212:109520.

78. Córdova-Ramos JS, Glorio-Paulet P, Hidalgo A, Camarena F. Effect of technological process on antioxidant capacity and total phenolic content of Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Scientia Agropecuaria*. 2020;11:157–65
79. Choquetico-Iquiapaza IY, Lopez-Huaman P, Gómez-Coca RB, Encina- Zelada CR, Tapia-Blácido DR, Pascual-Chagman GJ. Effect of Andean Lupin (*Lupinus mutabilis*) genotype and harvest altitude on the chemical composition and nutritional quality of flours. *Food Bioscience*. 2024 ;61:104921.
80. Aliboudhar H, Tigrine-Kordjani N, Lakache Z. Identification and Evaluation of Free Radical Scavenging Activity of Quinolizidine Alkaloids Isolated from Various Parts of *Anagyris foetida* Plant. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56:966–73.
81. Pascual-Chagman G, Santa-Cruz-Olivos J, Hidalgo A, Benavente F, Carmen Pérez-Camino M, Sotelo-Mendez A, et al. *Lupinus mutabilis* oil obtained by expeller press: Yield, physicochemical characterization, antioxidant capacity, fatty acids and oxidative stability analyses. *Scientia Agropecuaria*. 2021;12:219–27.
82. 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*. 2022;10.
83. Hadacek F, Bachmann G, Engelmeier D, Chobot V. Hormesis and a chemical Raison d'être for secondary plant metabolites. *Sage journals* . 2010;9(1):79–116.
84. Shen M, Yuan L, Zhang J, et al. Phytosterols: Physiological Functions and Potential Application. *Foods*. 2024;13(11):1754 .
85. Mareček V, Mikyška A, Hampel D, Čejka P, Neuwirthová J, Malachová A, et al. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science* 2017;73:40–5.

86. Bibi Sadeer N, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*. 2020;9(8):709.
87. Baldeón ME, Castro J, Villacrés E, Narváez L, Fornasini M. Efecto hipoglicemiante de *Lupinus mutabilis* cocinado y sus alcaloides en sujetos con diabetes tipo-2. *Nutr Hosp*. 2012;27:1261–6.
88. Hellal K, Mediani A, Ismail IS, Tan CP, Abas F. ¹H NMR-based metabolomics and UHPLC-ESI-MS/MS for the investigation of bioactive compounds from *Lupinus albus* fractions. *Food Research International*. 2021;140:110046.
89. Hellal K, Maulidiani M, Ismail IS, Tan CP, Abas F. Antioxidant, α -glucosidase, and nitric oxide inhibitory activities of six Algerian traditional medicinal plant extracts and ¹H-NMR-based metabolomics study of the active extract. *Molecules*. 2020;25.
90. Mazumder K, Rabiul Hossain M, Aktar A, Dash R, Farahnaky A. Biofunctionalities of unprocessed and processed flours of Australian lupin cultivars: Antidiabetic and organ protective potential studies. *Food Research International*. 2021;147:110536.
91. Paolisso G, Nenquin M, Schmeer W, Mathot F, Meissner HP, Henquin JC. Sparteine increases insulin release by decreasing the K⁺ permeability of the B-cell membrane. *Biochemical Pharmacology*. 1985 ;34(13):2355–61.
92. 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*. 2015;20:19085–100.
93. Subhan M, Sanacha K, Sungthong B, Datham S, Ratha J, Puthongking P. Comparison *in vitro* and *in silico* studies of phenolic acids and flavonoids on α -glucosidase inhibition. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy*. 2025;13:311-323.

94. Australia New Zealand Food Standards Code. Schedule 19. Maximum levels of contaminants and natural toxicants.2001. Internet. Disponible: <https://www.foodstandards.gov.au/food-standards-code/legislation>.
95. INEN Instituto Ecuatoriano de Normalización . Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 390:2004. Leguminosas. Grano desamargado de chocho.
96. Aneklaphakij C, Saigo T, Watanabe M, Naake T, Fernie AR, Bunsupa S, et al. Diversity of chemical structures and biosynthesis of polyphenols in nut-bearing species. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:642581.
97. Maoka, T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*. 2020;74, 1–16.
98. Bruneton, J. *Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales*. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. 1993:978-84-200-0956-8.
99. Roy B. Pathophysiological Mechanisms of Diabetes-Induced Macrovascular and Microvascular Complications: The Role of Oxidative Stress. *Med Sciences*.2025;13(3):87.
100. Zhou J, Wang W, Yin Z, Zheng G, Chen J, Li J, et al. Quercetin is a promising pancreatic lipase inhibitor in reducing fat absorption *in vivo*. *Food Bioscience* 2021;43:101248
101. Feng, X., Li, W., Wang, X. *et al*. Effect of magnetization on antibacterial, lipid-lowering and antioxidant activities of isoquinoline alkaloids. *Scientific Reports*.2025: 15, 3349.
102. Zahari A, Ablat A, Sivasothy Y, Mohamad J, Choudhary MI, Awang K. *In vitro* antiplasmodial and antioxidant activities of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Alseodaphne corneri* Kosterm. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016;9(4):328-332.

103. European Commission. Official Journal of the European Union. Commission Implementing Regulation (EU) 2025/119 . Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2025/119/oj/eng.
104. Radotić K, Stanković M, Bartolić D, Natić M. Intrinsic Fluorescence Markers for Food Characteristics, Shelf Life, and Safety Estimation: Advanced Analytical Approach. *Foods*. 2023;12(16):3023.
105. Zou L, Li H, Ding X, Liu Z, He D, Kowah JAH, Wang L, Yuan M, Liu X. A Review of The Application of Spectroscopy to Flavonoids from Medicine and Food Homology Materials. *Molecules*. 2022; 27:7766
106. Gliszczynskaswiglo A, Sikorska E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatogr A* . 2004;1048(2):195–8
107. Zou L, Harkey MR, Henderson GL. Effects of intrinsic fluorescence and quenching on fluorescence-based screening of natural products. *Phytomedicine* 2002;9(3):263–7
108. Parklak W, Ounjaijean S, Kulprachakarn K, Boonyapranai K. *In Vitro* α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Effects, Antioxidant Activities, and Lutein Content of Nine Different Cultivars of Marigold Flowers (*Tagetes* spp.). *Molecules*. 2023;28(8):3314.
109. Australia New Zealand Food Authority. Lupin alkaloids in food. In: Technical Report Series 200:3:1–21.
110. Cortés P., Tarvainen, M., Suomela, JP. et al. Profile and Content of Residual Alkaloids in Ten Ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after Aqueous Debittering Process. *Plant Foods Human Nutrition*. 2020 :75, 184–191.
111. Vo, C. Luu, N. Nguyen, T. Nguyen, T. Ho, B. Nguyen, T. Quoc-Thai Nguyen. Screening for pancreatic lipase inhibitors: Evaluating assay conditions using p-nitrophenyl palmitate as substrate. *All Life*. 2022;15(1), 13-22.

112. Wojdyło A, Nowicka P, Tkacz K, Turkiewicz IP. Comprehensive profiling of chlorophylls, carotenoids extracts and their derivatives in leaves of fruit tree species and assessment of antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*. 2026;512:148868.
113. Tkacz K, Turkiewicz IP, Nowicka P, Wojdyło A. Microspheres as carriers of sea buckthorn carotenoids and tocopherols with antidiabetic potential: Effect of biopolymers, cross-linking and storage. *Food Bioscience* 2024;59:103995.
114. Wojdyło A, Turkiewicz IP, Tkacz K, Nowicka P, Bobak Ł. Nuts as functional foods: Variation of nutritional and phytochemical profiles and their *in vitro* bioactive properties. *Food Chemistry X* . 2022;15:100418.
115. Janeček, Š., Svensson, B., & MacGregor, E. A. (2014). α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and molecular life sciences* .2014;71(7), 1149–1170.
116. Ernst H, Lo Leggio L, Willemoës M, Leonard G, Blum P, Larsen S. Structure of the *Sulfolobus solfataricus* alpha-glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *Journal of Molecular Biology*. 2006;358(4):1106–24.
117. Chiasson J, Josse R, Gomis R et al. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet*. 2002;359, 2072-2077.
118. Barrientos J, Morel E, Félix F, Vidrio B, Aceves A, Flores Á, et al. Efectos adversos gastrointestinales de viejos y nuevos antidiabéticos: ¿cómo los enfrentamos en la vida real? *Revista Gastroenterología México*. 2024;89(4):521–3.
119. Hrelia S, Angeloni C. New Mechanisms of Action of Natural Antioxidants in Health and Disease. *Antioxidants*. 2020;9(4):344
120. Zhou Y, Jiang Z, Lu H, et al. Recent Advances of Natural Polyphenols Activators for Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Chemistry & Biodiversity*. 2019;16(11):e1900400.

121. Ooi B, Chan K, Goh B, Yap W. The Role of Natural Products in Targeting Cardiovascular Diseases via Nrf2 Pathway: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1308.



7. ANEXOS

Anexo 1. Ejemplo de curvas de calibración del método de inhibición del radical libre ABTS^{•+}.

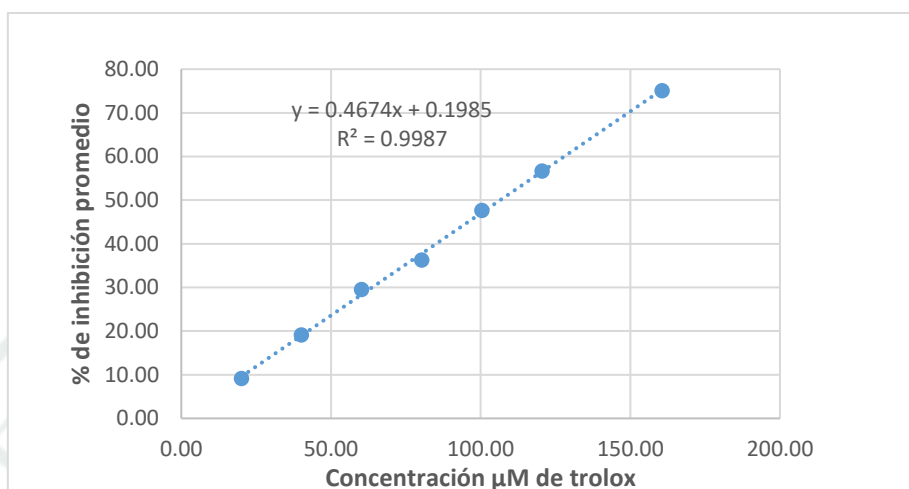


Figura 15. Curva de calibración utilizada para el análisis de la fracción hidrofílica y alcaloide aplicada en el método de inhibición del radical libre ABTS^{•+}

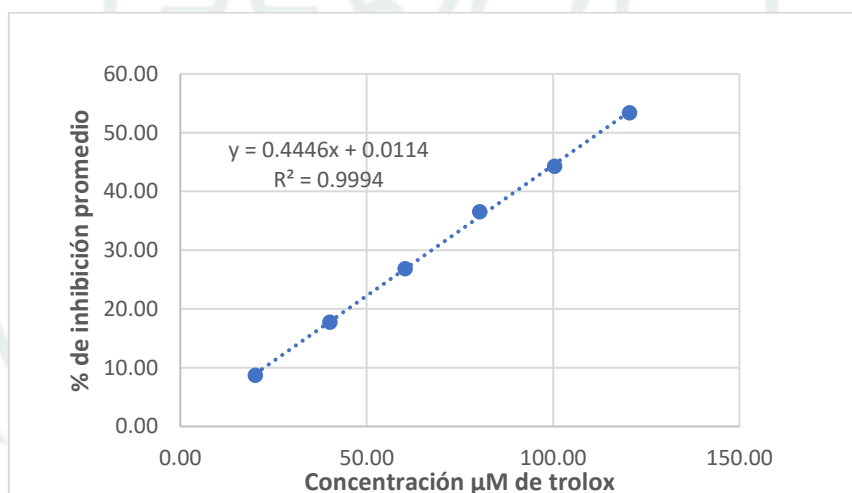


Figura 16. Curva de calibración utilizada para el análisis de la fracción lipofílica aplicada en el método de inhibición del radical libre ABTS^{•+}

Anexo 2. Ejemplo de curvas de calibración del método de inhibición del radical libre DPPH[•].

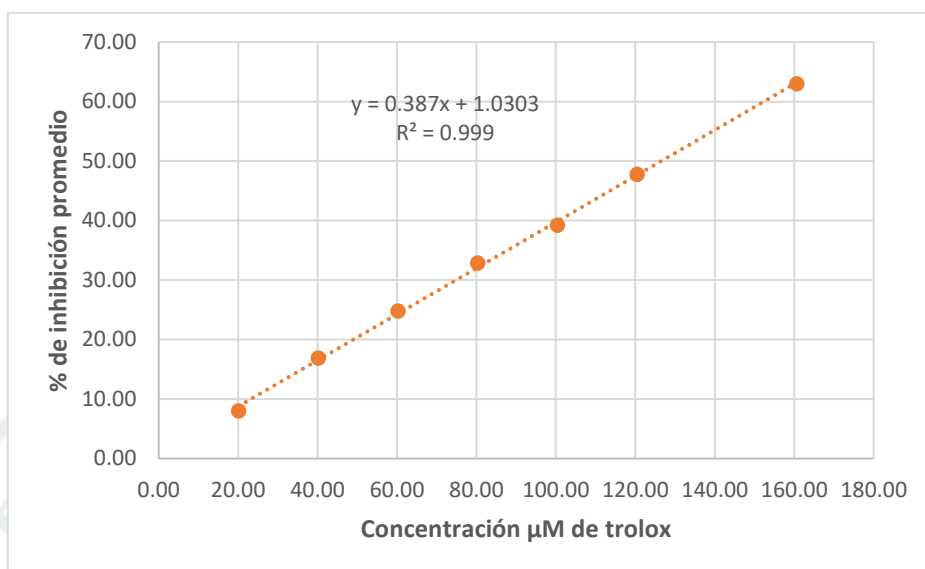


Figura 17. Curva de calibración utilizada para el análisis de la fracción hidrofílica y alcaloide aplicada en el método de inhibición del radical libre DPPH[•].

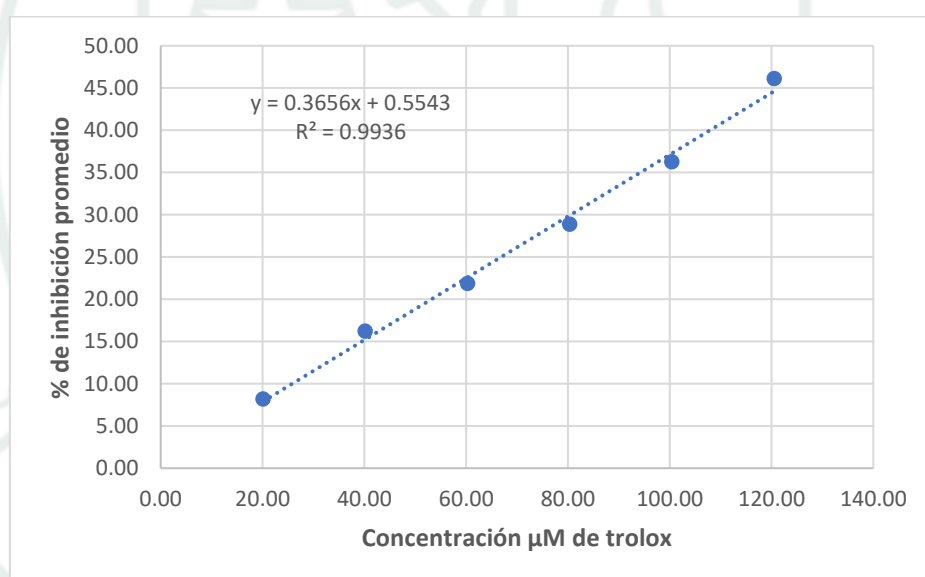


Figura 18. Curva de calibración utilizada para el análisis de la fracción lipofílica aplicada en el método de inhibición del radical libre DPPH[•].

Anexo 3. Resultados de la capacidad antioxidante determinados por el método DPPH*

Tabla 8. Capacidad antioxidante *in vitro* de las fracciones hidrofílica (FH), lipofílica (FL) y alcaloidal (FA) por el método de inhibición del radical libre DPPH* ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$)

Variedad	FH	FL	Total	FA
TA	178,2 $\pm$ 4,1 ^{Aa}	72,8 $\pm$ 6,1 ^{Ab}	251,1 $\pm$ 6,6	ND
TAG	140,4 $\pm$ 1,8 ^{Ba}	58,2 $\pm$ 2,2 ^{CBb}	198,5 $\pm$ 1,6	8,3 $\pm$ 2,2
TCF	110,5 $\pm$ 7,9 ^{Ca}	57,0 $\pm$ 4,3 ^{CBb}	167,6 $\pm$ 10,3	ND
TY	90,1 $\pm$ 1,6 ^{Da}	55,2 $\pm$ 4,3 ^{Cb}	145,3 $\pm$ 3,7	ND
TPG	118,5 $\pm$ 4,5 ^{Ca}	65,3 $\pm$ 5,6 ^{BAb}	183,9 $\pm$ 6,8	ND

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n = 4). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre variedades, mientras que letras minúsculas diferentes en una misma fila indican diferencias significativas entre las fracciones, según la prueba de Tukey (p < 0,05). ND: no determinado.

Anexo 4. Resultados de la capacidad antioxidante determinados por el método ABTS⁺

Tabla 9. Capacidad antioxidante *in vitro* de las fracciones hidrofílica (FH), lipofílica (FL) y alcaloidal (FA) por el método de inhibición del radical libre ABTS⁺ ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bs}$)

Variedad	FH	FL	Total	FA
TA	13974 $\pm$ 744 ^{Ba}	663 $\pm$ 25 ^{ABCb}	14637 $\pm$ 765	10119 $\pm$ 653 ^{BCc}
TAG	15282 $\pm$ 548 ^{Aa}	445 $\pm$ 17 ^{Ab}	15727 $\pm$ 560	9694 $\pm$ 762 ^{Cc}
TCF	13645 $\pm$ 429 ^{ABa}	545 $\pm$ 14 ^{BCb}	14190 $\pm$ 440	9629 $\pm$ 615 ^{BCc}

TY	12975 ± 405 ^{Ca}	656 ± 23 ^{ABb}	13453 ± 407	11919 ± 610 ^{Ac}
TPG	12608 ± 252 ^{Ca}	599 ± 10 ^{Cb}	13165 ± 260	10037 ± 304 ^{ABc}

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 4). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre variedades, mientras que letras minúsculas diferentes en una misma fila indican diferencias significativas entre fracciones, según la prueba de Tukey (p < 0,05). ND: no determinado.

Anexo 5. Análisis estadísticos de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical DPPH[•], en 5 variedades de tarwi.

ANOVA TWO WAY

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado o medio	F-valor	p-valor
Fraccion	1	43357	43357	2024.76	4.25e-29
variedad	4	43357	3171	148.11	2.69e-19
Fraccion/variedad	4	6203	1550	72.42	5.62e-15
residuals	30	642	21		

TUKEY - Variedad

Variedad	Fracción	Grupo
TA	FH	a
TA	FL	b
TAG	FH	a
TAG	FL	b
TCF	FH	a
TCF	FL	b
TPG	FH	a
TPG	FL	b
TY	FH	a
TY	FL	b

TUKEY - FRACCIÓN

FH	Grupo
TA	A
TAG	B
TCF	C
TPG	C
TY	A

FL	Grupo
TA	A
TY	A
TPG	A
TCF	A
TAG	A

Anexo 6. Análisis estadísticos de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical ABTS^{•+}, en 5 variedades de tarwi.

ART (Aligned Rank Transform)

Tratamiento	DF	Df. residuals	F-valor	p-valor
Fraccion	2	45	183,39	<2,2e-16
variedad	4	45	8,56	3,172e-05
Fraccion/variedad	8	45	15,75	9,72e-11

TUKEY - Variedad

Variedad	Fracción	Grupo
TA	FH	a
TA	FL	b
TA	FA	c
TAG	FH	a
TAG	FL	b
TAG	FA	c
TCF	FH	a
TCF	FL	b
TCF	FA	c
TPG	FH	a
TPG	FL	b
TPG	FA	c
TY	FH	a
TY	FL	b
TY	FA	c

TUKEY - FRACCIÓN

FA	Grupo
TY	A
TPG	AB
TA	BC
TCF	BC
TAG	C

FH	Grupo
TAG	A
TCF	AB
TA	B
TPG	C
TY	C

FL	Grupo
TPG	A
TY	AB
TA	ABC
TCF	BC
TPG	C

Anexo 7. Control positivo de inhibición de las enzimas digestivas α -glucosidasa utilizando acarbosa.

Tabla 10. Control positivo con acarbosa para la α -glucosidasa.

Repeticiones	% de inhibición	Promedio
1	85.81	85.98
2	85.65	
3	86.16	
4	86.73	
5	86.45	
6	85.19	
7	87.50	
8	86.59	
9	85.73	
10	85.38	
11	85.87	
12	84.77	

Anexo 8. Actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima α -glucosidasa

Tabla 11. Actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima α -glucosidasa (% de inhibición) de semillas de tarwi de diferentes variedades comerciales.

Variedad	FH			FL			FA
	1,2 mg ¹	2 mg	10 mg	1,2 mg	2 mg	10 mg	10 mg
TA	7,6 $\pm$ 2,6 ^b	8,7 $\pm$ 0,9 ^b	30,4 $\pm$ 1,9 ^c	ND	2,0 $\pm$ 2,3 ^c	9,4 $\pm$ 2,5 ^d	ND
TAG	15,8 $\pm$ 3,9 ^a	18,0 $\pm$ 0,5 ^a	33,7 $\pm$ 1,3 ^{bc}	ND	0,8 $\pm$ 0,5 ^c	5,9 $\pm$ 1,2 ^{de}	ND
TCF	14,2 $\pm$ 4,6 ^{ab}	19,1 $\pm$ 2,1 ^a	44,9 $\pm$ 3,7 ^a	ND	0,6 $\pm$ 2,3 ^c	6,5 $\pm$ 1,2 ^{de}	ND
TY	13,2 $\pm$ 0,8 ^{ab}	17,9 $\pm$ 0,5 ^a	43,8 $\pm$ 1,2 ^a	2,5 $\pm$ 3,7	3,9 $\pm$ 3,1 ^{bc}	8,9 $\pm$ 2,1 ^d	ND
TPG	12,8 $\pm$ 2,4 ^{ab}	16,1 $\pm$ 3,9 ^a	36,9 $\pm$ 2,2 ^b	3,1 $\pm$ 1,9	3,5 $\pm$ 2,8 ^{bc}	3,7 $\pm$ 1,6 ^e	ND
Acarbosa	0,25 mg 85,4 $\pm$ 0,7						

Valores expresados como media $\pm$ desviación estándar (n = 4). Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p < 0,05). Donde: FH: fracción hidrofílica, FL: fracción lipofílica, FA: fracción alcaloide. 1Dosis de la muestra. ND: no detectada.

Anexo 9. Análisis estadísticos de la capacidad antihiper glucémica por el método de inhibición de la enzima α -glucosidasa en 5 variedades de tarwi.

ANOVA TWO WAY -10 mg

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
Fraccion	1	9637	9637	2336,19	<2e-16
variedad	4	354	88	21,43	1,95e-08
Fraccion/variedad	4	369	92	22,34	1,23e-08
d residuals	30	124	4		

TUKEY – 10 mg

Variedad	Fracción	Grupo
TCF	FL	a
TY	FL	a
TPG	FL	b
TAG	FL	bc
TA	FL	c
TA	FH	d
TY	FH	d
TCF	FH	de
TAG	FH	de
TPG	FH	e

ANOVA TWO WAY - 2 mg

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
Fraccion	1	1920	1920	2336,19	<2e-16
variedad	4	145	36	7,36	0.00029

Fraccion/variedad	4	174	43	8,827	7,79e-05
d					
residuals	30	148	4		

TUKEY – 2 mg

Variedad	Fracción	Grupo
TCF	FL	a
TAG	FL	a
TY	FL	a
TPG	FL	a
TA	FL	b
TY	FH	bc
TPG	FH	bc
TA	FH	c
TAG	FH	c
TCF	FH	c

ANOVA ONE WAY -1,2 mg

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado o medio	F-valor	p-valor
variedad	4	151	37	3,759	0.026
residuals	15	150	10		

TUKEY -1,2mg

1,2 mg	Grupo
TAG	a
TCF	ab
TY	ab
TPG	ab
TA	b

Anexo 10. Control positivo de inhibición de las enzimas digestivas α -amilasa utilizando acarbosa.

Tabla 12. Control positivo con acarbosa para la α -amilasa .

Repeticiones	% de inhibición	Promedio
1	86.14	85.35
2	85.03	
3	85.28	
4	85.22	
5	85.21	
6	85.09	
7	85.77	
8	84.89	
9	83.77	
10	85.87	
11	85.18	
12	86.76	

Anexo 11. Actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima α -amilasa

Tabla 13. Actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima α -amilasa (% de inhibición) de semillas de tarwi de diferentes variedades comerciales.

Variedad	FH	FL	FA		
	50 mg ¹	50 mg	12,5 mg	25 mg	50 mg
TA	11 $\pm$ 4,7	ND	16,4 $\pm$ 4,3 ^a	28,7 $\pm$ 8,8	72,6 $\pm$ 14,1
TAG	5,1 $\pm$ 2,7	ND	7,9 $\pm$ 2,8 ^{ab}	14,1 $\pm$ 5,8	53,9 $\pm$ 20,9
TCF	ND	ND	3,4 $\pm$ 2,0 ^b	24,6 $\pm$ 14,1	77,9 $\pm$ 9,8
TY	ND	ND	ND	9,8 $\pm$ 4,8	52,5 $\pm$ 13,3
TPG	2,3 $\pm$ 0,9	ND	12,8 $\pm$ 7,9 ^{ab}	20,5 $\pm$ 5,2	70,8 $\pm$ 14,2
Acarbosa	0.1 mg 85,9 $\pm$ 0,7				

Valores expresados como media $\pm$ desviación estándar (n = 4). Letras diferentes dentro de cada fracción indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p < 0,05). Números sin letras indican que no hubo diferencia significativa. Donde: FH: fracción hidrofílica, FL: fracción lipofílica, FA: fracción alcaloide. ¹Dosis de la muestra. ND: no detectada

Anexo 12. Análisis estadísticos de la capacidad antihiper glucémica por el método de inhibición de la enzima α -amilasa en 5 variedades de tarwi.

ANOVA ONE WAY

Concentración: 50 mg

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
variedad	4	2147	536	6,437	0.096
residuals	15	3305	220		

Concentración: 25 mg

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
variedad	4	817	204	62301	0.107
residuals	15	1332	88		

Concentración: 12,5mg

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
variedad	3	323	107	4,621	0.0321
residuals	9	209	23		

TUKEY 12,5 mg

12.5 mg	Grupo
TA	a
TPG	ab
TAG	ab
TCF	b

Anexo 13. Análisis estadístico estándar Esparteina

ANOVA ONE WAY

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
Concentración	2	1,715	0,8575	0,779	0.487
residuals	9	9,904	1,1004		

Anexo 14 Análisis estadístico estándar Lupanina

ANOVA ONE WAY

Tratamiento	DF	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F-valor	p-valor
Concentración	2	0,28	0,140	0,024	0.976
residuals	9	52,42	5,824		