

Evaluación de la extracción de alcaloides de la semilla de tarwi (*Lupinus mutabilis*), por microondas, ultrasonido y convencional

Evaluation of the extraction of alkaloids from the tarwi seed (*Lupinus mutabilis*), by microwave, ultrasound and conventional

Seguil Mirones, C⁽¹⁾, Egas Peña, E⁽²⁾, Avilez Hinojosa, J⁽¹⁾, Blas Buendía, C⁽¹⁾, Huamanlazo Zurita, M⁽¹⁾

⁽¹⁾Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional del Centro del Perú

⁽²⁾Investigadora independiente

E- Mail: cseguil@uncp.edu.pe.

Resumen: El trabajo de investigación, evaluó tres métodos de extracción de alcaloides quinolizidínicos del tarwi (*Lupinus mutabilis*), relacionando: la potencia de microondas, la potencia ultrasónica a una frecuencia de 40 kHz y la agitación con la cantidad de alcaloides residuales en la torta de tarwi. Los parámetros de extracción fueron: 600, 700 y 800 watts para la extracción asistida por microondas; 20 %, 50 % y 80 % de potencia ultrasónica para la extracción asistida por ultrasonido; 60, 90 y 120 R.P.M. para la extracción convencional, para las extracciones se utilizó agua como solvente. Se aplicó el diseño de bloques completamente al azar con un nivel de significancia del 5 %; se realizó la superficie de respuesta para cada evaluación. Los resultados muestran que existen diferencias significativas para todas las extracciones respecto a los parámetros en estudio y por la prueba según Tukey al 5 %, se tiene que: la menor potencia (600 watts) se obtiene la mayor extracción 0,909 % (alcaloide residual); con la potencia ultrasónica intermedia (50 %) la mayor extracción 1,643 % residual; a mayor agitación (120 R.P.M.) mayor extracción 0,85 % (alcaloide residual).

Frases claves: Alcaloides quinolizidínicos, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido.

Abstract: The research work evaluated three methods of extracting quinolizidine alkaloids from tarwi (*Lupinus mutabilis*), relating: microwave power, ultrasonic power at a frequency of 40 kHz and agitation with the amount of residual alkaloids in tarwi cake. The extraction parameters were: 600, 700 and 800 watts for microwave assisted extraction; 20 %, 50 % and 80 % ultrasonic power for ultrasonic assisted extraction; 60, 90 and 120 R.P.M. For conventional extraction, water was used as a solvent for extractions. The completely randomized block design with a significance level of 5 % was applied; the response surface was made for each evaluation. The results show that there are significant differences for all the extractions with respect to the parameters under study and for the test according to Tukey at 5 %, it is necessary that: the lower power (600 watts) the greater extraction 0,909 % (residual alkaloids); with the intermediate ultrasonic power (50 %) the highest extraction 1,643 % (residual alkaloids); the greater the agitation (120 R.P.M.) the greater extraction 0,85% (residual alkaloids).

Key phrases: Quinolizidine alkaloids, microwave-assisted extraction, ultrasound-assisted extraction.

1. Introducción

Las extracciones de diferentes componentes de las matrices naturales que la contienen, ha sido una de las preocupaciones de la humanidad, para ello se han utilizado diferentes métodos tradicionales como la percolación, digestión entre otros, en el siglo XX estas técnicas han sido reemplazadas por otras que han aumentado la eficiencia, la selectividad y son más amigables con el medio ambiente, entre las cuales se pueden mencionar las que utilizan fluidos supercríticos, ondas de ultrasonido, microondas, etc. (Khoddami, Wilkes y Roberts 2013), se fundamentan en la transferencia selectiva del bioactivo a través de un solvente orgánico desde una mezcla sólida. Se obtendrá una mayor transferencia cuando existe diferencia de solubilidad entre disolvente de extracción, bioactivo de interés y los otros compuestos existentes en la mezcla inicial (Angurel *et al.*, s.f.).

En la extracción asistida por microondas (EAM), se calienta el solvente (extractor) que se encuentra en contacto con la muestra con energía de microondas, los solventes más utilizados para la extracción de bioactivos son: agua, etanol, acetona, metanol, isopropanol y acetonitrilo (Khoddami, Wilkes y Roberts; 2013). La EAM utiliza la capacidad de algunos líquidos y sólidos para transformar la energía electromagnética en calor, lo que lleva a un calentamiento efectivo que puede incrementar la velocidad de reacción o extracción en condiciones hidrotermales y, en ocasiones, mejorar la selectividad de los compuestos objetivo. El principio de calentamiento se da por conducción iónica y rotación de dipolo que genera un efecto directo de las microondas en las moléculas. Estos dos mecanismos tienen lugar simultáneamente. Al aplicar un campo magnético genera la migración electroforética de iones produciéndose la conducción iónica. La solución genera resistencia a este flujo de iones, produciéndose la fricción y, por lo tanto, el aumento de temperatura de la solución. La rotación del dipolo significa la realineación de los dipolos con el campo aplicado. A 2 450 MHz, que es la frecuencia utilizada en los sistemas comerciales, los dipolos se alinean y aleatorizan $4,9 \times 10^9$ veces por segundo, y este movimiento molecular forzado resulta en calentamiento (Quitain, Ozturk, Mission y Sasaki; 2017). Este fenómeno de calentamiento como consecuencia a la rotación del dipolo y la conducción producida por los iones que pueden estar presentes en el solvente y soluto, son los responsables del

aumento del rendimiento de extracción asistida por microondas (EAM) (Lovrić *et al.*, 2017), por una mayor extracción de los biocomponentes, debido a un incremento del ingreso del solvente en la matriz, generado por la ruptura de los enlaces de hidrógeno (Zhu, Su, Cai y Yang; 2006). Las ventajas que presenta este tipo de extracción si se compara con otros métodos convencionales, tendría que mencionar: tiempos cortos de extracción, altos rendimientos, poco uso de reactivos y manipulación mínima de la muestra (Elez, Dragović-Uzelac, Režek, y Jukić, 2013).

En la extracción asistida por ultrasonido (EAU), se aprovecha las ondas de presión que se transmiten a través de un medio como ciclos de compresión y expansión (rarefacción), puede representarse como una serie de líneas verticales (la intensidad se relaciona con la separación entre líneas) o como una forma de onda sinusoidal (la intensidad se relaciona con la amplitud). Cuando un medio líquido se somete a sonicación, se produce una presión acústica, que se agrega a la presión hidrostática, en el medio. La fase de compresión ejerce una presión positiva, lo que hace que las moléculas del medio se acerquen y la fase de rarefacción ejerce una presión negativa que las separa (Mason y Lorimer, 2002 en Lavilla y Bendicho, 2017).

Considerando la energía para inducir el movimiento vibratorio de las moléculas medias, este rango se divide en ultrasonido de baja potencia (alta frecuencia) (LPU, con frecuencias superiores a 100 kHz) y ultrasonido de alta potencia (baja frecuencia) (HPU, con frecuencias entre 16/20 y 100 kHz).

Los efectos de la HPU se basan en el fenómeno de cavitación, ésta se genera bajo la irradiación con ultrasonido, con la formación de microburbujas de vapor, causando la ruptura de las paredes celulares biológicas que facilita la penetración del disolvente, incrementando la extracción de componentes bioactivos (Lavilla y Bendicho, 2017), lo que genera los efectos químicos del ultrasonido, por lo tanto, la concentración de energía es la causa de la interacción indirecta del ultrasonido con la materia (Mason y Peters, 2011 en Lavilla y Bendicho, 2017); una microburbuja de cavitación se puede considerar como un microrreactor con alta temperatura (4 500 – 5 000 °K) y presión (superiores a 1 000 atmósferas), lo que produce la formación de especies altamente reactivas y estados excitados (Chen, Sharma y Mudhoo; 2011 en Lavilla y Bendicho; 2017). Existen dos fenómenos de cavitación transitoria y estable; la estable tiene lugar a bajas

intensidades y los efectos químicos que se pueden lograr son deficientes; en cambio en la cavitación transitoria que tiene lugar a altas intensidades y producen efectos químicos (Lavilla y Bendicho, 2017). La aplicación de ultrasonido de alta potencia, se fundamenta al fenómeno de cavitación acústica, que genera ondas acústicas de alta intensidad en el fluido, produciendo incrementos en las extracciones. Existen dos fenómenos físicos, el primero la difusión por las paredes celulares y el segundo el lavado y arrastre del contenido celular, una vez liberados por el primer fenómeno (Vinaturi, 2001). Ambos fenómenos están significativamente afectados por la radiación ultrasónica. El incremento de la transferencia de masa se produce por los efectos de la cavitación inducida por ultrasonidos, que aumenta la permeabilidad de los tejidos de las plantas (Gaete-Garretón, Vargas-Hernández, Cares-Pacheco, Sainz y Alarcón; 2011).

Los alcaloides se localizan en los tejidos periféricos en los diferentes órganos de la planta, es decir las capas externas de los frutos, semillas, raíces, epidermis de las hojas y corteza del tallo; debido al sabor astringente y amargo, los alcaloides cumplen diferentes funciones en la planta, la más importante posiblemente sea la de protección del ataque de microorganismos e insectos (Lara, 1999).

El tarwi es una leguminosa, que se utiliza para la alimentación humana y animal, en América del Sur la especie *Lupinus mutabilis* contiene nutrientes en cantidad interesante; alto contenido en grasa hasta 25 % en las

semillas (Torres-Tello, 1976), aceite comestible que podría extraerse; proteínas alrededor de 41 % muy semejante a la soya entre otros componentes nutritivos (Baer, Reimerdes & Feldheim, 1979); sin embargo la semilla almacena un alto contenido de alcaloides quinolizidínicos tóxicos, entre 3 a 5 % dependiendo del origen, que es necesario extraerlo, para aprovechar estas semillas (Hatzold, *et al.*; 1983).

El objetivo general fue: Evaluar el efecto de la extracción asistida por microondas, ultrasonido y convencional en la cantidad de alcaloides quinolizidínicos extraídos de la semilla de tarwi (*Lupinus mutabilis*) y los objetivos específicos: Relacionar la potencia en la extracción asistida por microondas, con la cantidad de alcaloides quinolizidínicos extraídos de la semilla de tarwi (*Lupinus mutabilis*). Determinar la relación de la potencia ultrasónica en la extracción asistida por ultrasonido, con la cantidad de alcaloides quinolizidínicos extraídos de la semilla de tarwi (*Lupinus mutabilis*). Establecer la relación que existe entre la agitación en la extracción convencional, con la cantidad de alcaloides quinolizidínicos extraídos de la semilla de tarwi (*Lupinus mutabilis*).

La investigación, se justifica porque establecerá los parámetros para obtener mayores extracciones de alcaloides quinolizidínicos en harina de tarwi, utilizando agua, utilizando dos métodos limpios de extracción: por microondas, ultrasonido y la otra convencional utilizando un biorreactor.

12,25 cm, con rotor FASTEX de 24 viales de vidrio descartable de 100 mL. Equipo ultrasonido tipo baño, marca: Wisd de 40 kHz, modelo WUC-DO6H, potencia de salida 253 W. Biorreactor marca Eppendorf modelo bioflo 120. Balanza analítica Adventurer OHAUS, modelo AR3130, capacidad 300 g., legibilidad 0,001 g, linealidad $\pm 0,002$ g. Agitador, marca New Brunswick Scientific. Espectrofotómetro marca Genesys, modelo G10S UV-Vis. Secador de cabina por convección de aire caliente. Destilador de agua. Materiales de vidrio. Micropipetas (50 – 100 μ L), (500 – 1 000 μ L). Tamizador MS TYLER con tamices (mallas: 20 y 18).

Reactivos

Hidróxido de potasio q.p., púrpura de bromocresol, óxido de aluminio (Al_2O_3), alcohol isopropílico q.p., cloroformo.

2. Materiales y métodos

Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de química de alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional del Centro del Perú.

Materia prima

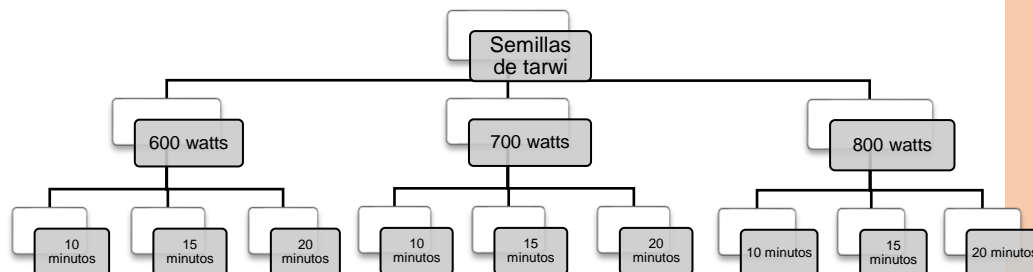
Se utilizó tarwi (*Lupinus mutabilis*) sembrado y cosechado en la provincia de Jauja, distrito de Acolla, cosecha 2017.

Material y equipos

Sistema extractor por microondas ETHOS UP, potencia de microondas 2 x 950 W, frecuencia de microondas 2,45 GHz

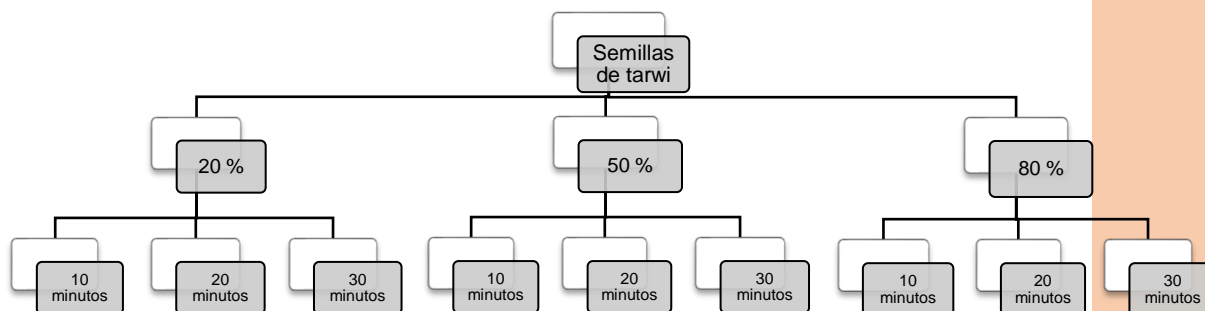
Diseño de la investigación

a. Extracción asistido por microondas



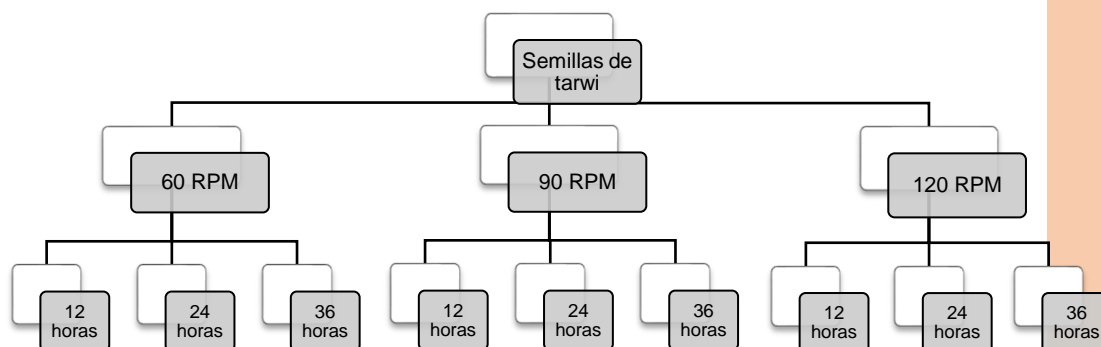
Potencia de operación: 600 watts, 700 watts y 800 watts
 Tiempo de extracción: 10 minutos, 15 minutos y 20 minutos

b. Extracción asistido por ultrasonido



Frecuencia de operación: 40 kHz: Energía ultrasónica 20 %, 50 % y 80 %.
 Tiempo de extracción: 10 minutos, 20 minutos y 30 minutos.

c. Extracción convencional (biorreactor)



Agitación de operación: 60 RPM, 90 RPM y 120 RPM
 Tiempo de extracción: 12 horas, 24 horas y 36 horas

Métodos analíticos

- a. **Preparación de la muestra**, las semillas de tarwi se sometieron a una molienda, luego se tamizó para obtener un tamaño de partícula ($0,85 \text{ mm} < \phi < 1,00 \text{ mm}$).
- b. **Pretratamiento antes de la extracción**, 1,5 g semillas molidas se someterán a un pretratamiento, para la extracción asistida por microondas con 20 mL de agua destilada en el vaso de extracción a 700 watts - 85 °C por 20 minutos; para el caso de la extracción asistida por ultrasonido con 20 mL de agua destilada en el vaso de extracción a 40 kHz – energía ultrasónica 50 % - 45 °C por 20 minutos y para la extracción en el biorreactor 20 g de muestra con 500 mL de agua destilada a 120 RPM - 60 °C por 75 minutos; se cambia el agua del pretratamiento y se procede a los tratamientos de

extracción controlando las variables para cada tipo de extracción.

- c. **Determinación de alcaloides por el método espectrofotométrico**, la determinación se realizó a la a la torta de tarwi después de cada extracción. Método de púrpura de bromocresol (BKP) planteado por Von Baer (1978) en Sosa (2000) y Castillo (1979).
- d. **Técnicas y procesamiento de datos**, se aplicó un diseño de bloques completo aleatorio (DBCA) cuyos tratamientos son: tres potencias de microondas para la extracción asistida por microondas, tres energías ultrasónicas para la extracción asistida por ultrasonido y tres velocidades de agitación para la extracción con el biorreactor, con tres bloques (tiempos de extracción), con nivel de significancia de 5 %. Se utilizó el paquete estadístico Minitab 17

3. Resultados

a. Contenido de alcaloides residuales después de las extracciones

a.1 Extracción asistida por microondas

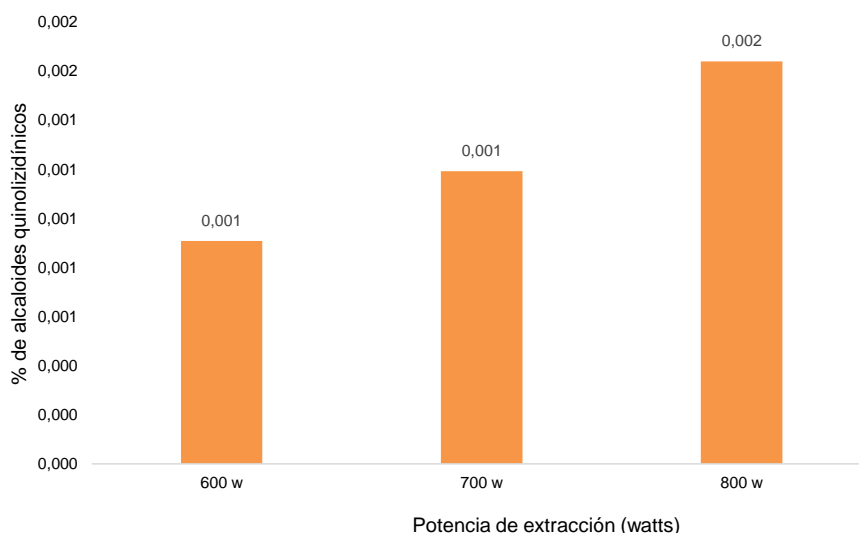
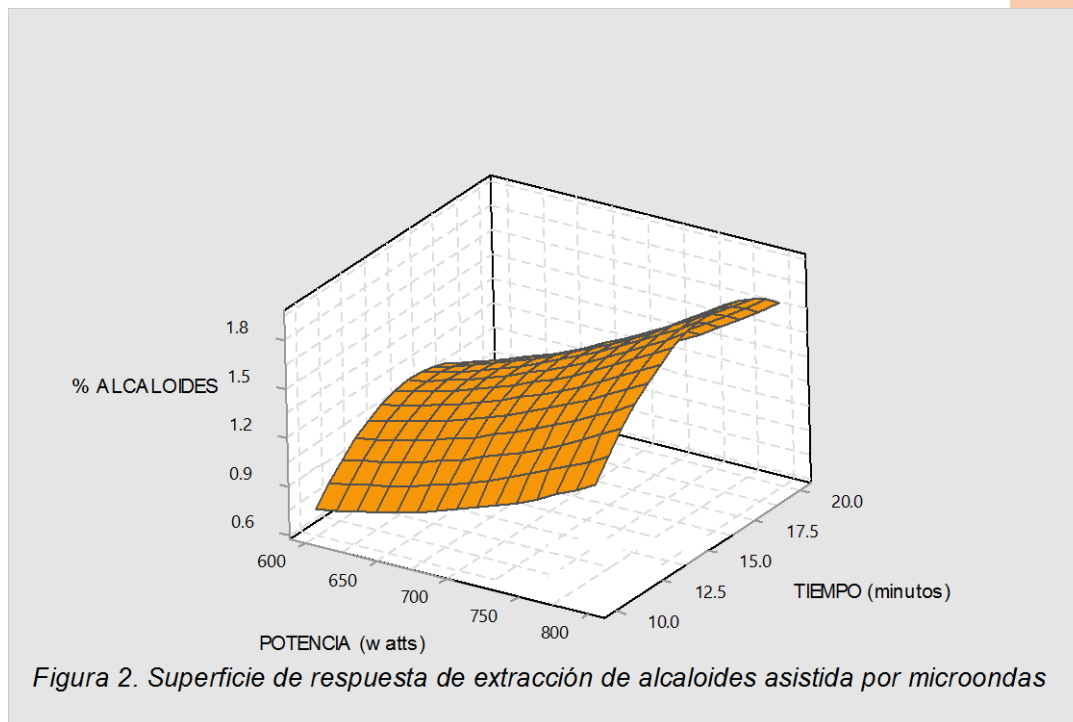


Figura 1. Alcaloides residuales después de la extracción asistida por microondas

Evaluación estadística de la extracción asistida por microondas, con un nivel de significancia del 5 %; existe diferencia significativa en la cantidad residual de alcaloides quinolizidínicos, entre las diferentes potencias utilizadas. Aplicando la prueba de diferencias significativas según Tukey con un nivel de significancia del 5 %, se obtiene:

Factor	N	Mean	Grouping
T ₃ (800 w)	3	1,640	A
T ₂ (700 w)	3	1,1931	A B
T ₁ (600 w)	3	0,9088	B



La ecuación de regresión es:

$$\% \text{ Alcaloides} = 0,70 - 0,0099 \text{ potencia (watts)} + 0,371 \text{ tiempo (minutos)} + 0,000008 [\text{potencia (watts)}]^2 - 0,01507 [\text{tiempo (minutos)}]^2 + 0,000149 \text{ potencia (watts)} * \text{tiempo (minutos)}$$

a.2 Extracción asistida por biorreactor (convencional)

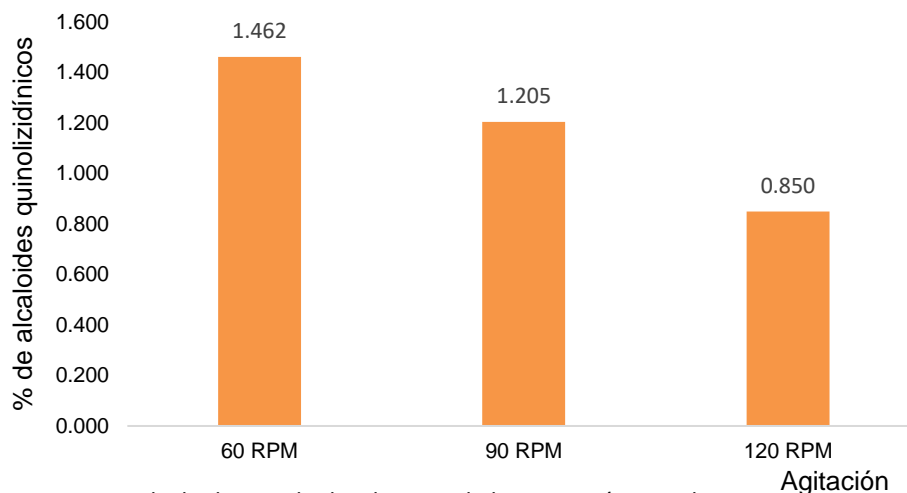


Figura 3. Alcaloides residuales despues de la extracción con el biorreactor (tradicional)

Evaluación estadística de la extracción convencional con biorreactor, con un nivel de significancia del 5 %; existe diferencia significativa en la cantidad residual de alcaloides quinolizidínicos, entre las diferentes agitaciones utilizadas. Aplicando la prueba de diferencias significativas según Tukey con un nivel de significancia del 5 %, se obtiene:

Factor	N	Mean	Grouping
C ₁ (60 RPM)	3	1,462	A
C ₂ (90 RPM)	3	1,2053	A B
C ₃ (120 RPM)	3	0,8500	B

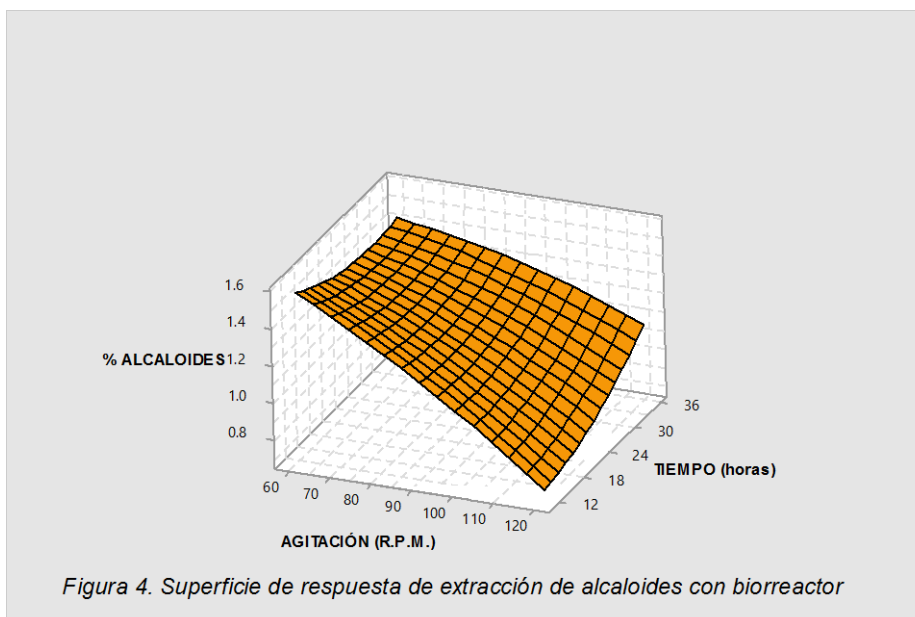


Figura 4. Superficie de respuesta de extracción de alcaloides con biorreactor

La ecuación de regresión es:

$$\% \text{ Alcaloides} = 2,528 - 0,0084 \text{ agitación (R.P.M.)} - 0,0487 \text{ tiempo (horas)} - 0,000055 [\text{agitación (R.P.M.)}]^2 + 0,000478 [\text{tiempo (horas)}]^2 + 0,000336 \text{ agitación (R.P.M.)} * \text{tiempo (horas)}$$

a.3 Extracción asistida por ultrasonido a 40 kHz

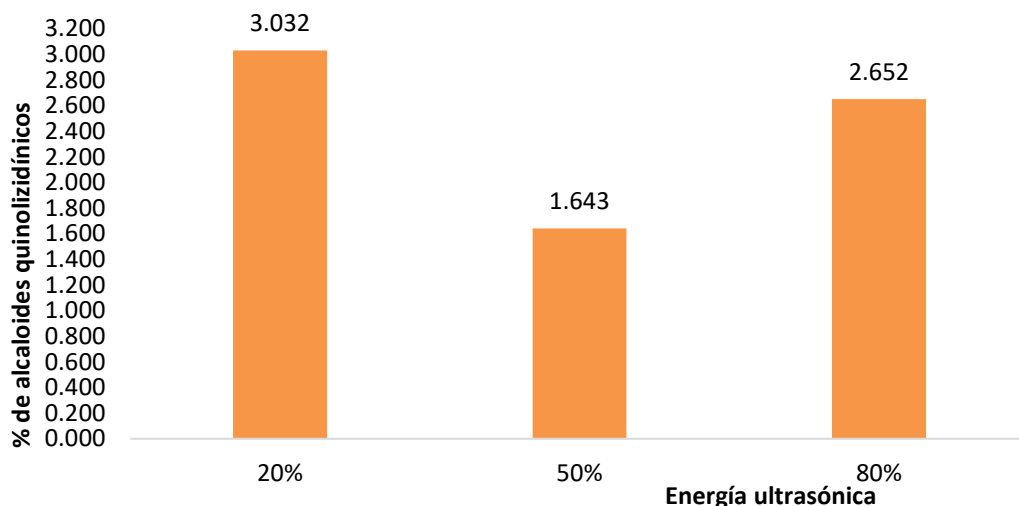
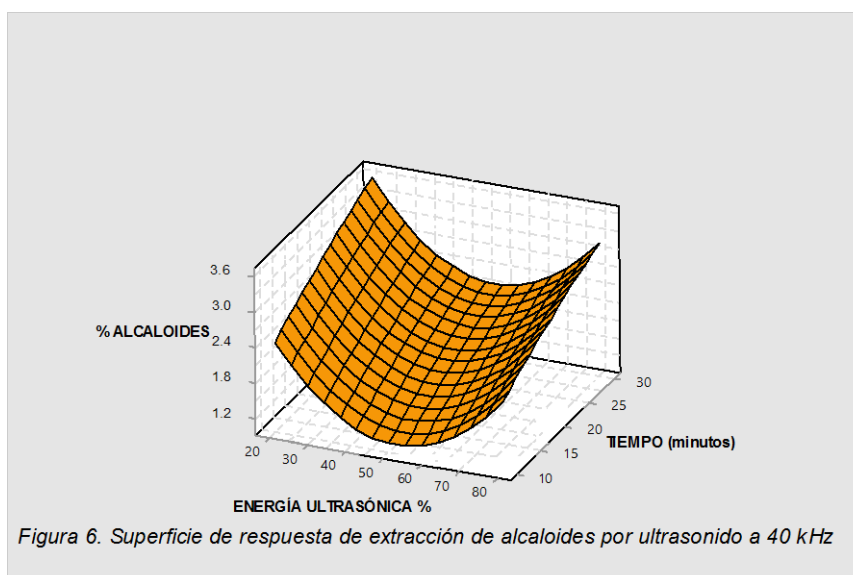


Figura 5. Alcaloides residuales despues de la extracción asistida por ultrasonido a 40 kHz

Evaluación estadística de la extracción asistida por ultrasonido a 40 kHz , con un nivel de significancia del 5 %; existe diferencia significativa en la cantidad residual de alcaloides quinolizidínicos, entre los diferentes porcentajes de energía ultrasónica utilizadas. Aplicando la prueba de

diferencias significativas según Tukey con un nivel de significancia del 5 %, se obtiene:

Factor	N	Mean	Grouping
U ₁ (20 %)	3	3,032	A
U ₃ (80 %)	3	2,652	A B
U ₂ (50 %)	3	1,643	B



$$\% \text{Alcaloides} = 3,891 - 0,13829 \text{ energía ultrasónica } \% + 0,0859 \text{ tiempo (minutos)} + 0,001332 (\text{energía ultrasónica } \%)^2 - 0,000683 \text{ tiempo (minutos)}^2 - 0,000062 \text{ energía ultrasónica } \% * \text{tiempo (minutos)}$$

4. Discusiones

a. Extracción asistida por microondas

De la figura 1, se puede apreciar que cuando aumenta la potencia de extracción, los alcaloides residuales son mayores, por lo que a 600 watts se obtiene una extracción mayor de los alcaloides logrando tener 0,909 % de alcaloides en la torta de tarwi, estadísticamente existe diferencias entre las potencias de extracción, por lo que a 600 watts es el parámetro de extracción por microondas. Analizando la figura 2, se puede apreciar que la condición óptima de extracción asistida por microondas es a 600 watts por 10 minutos, esto se debe que altas temperaturas que están relacionados con las altas potencias, pueden causar la degradación en la composición de los alcaloides lo que disminuye la capacidad de extracción (Wang y Weller, 2006). También

queda de manifiesto que existe significancia en la extracción, tanto por la potencia y tiempo de extracción, respecto al tiempo se puede apreciar que a 10 minutos se tienen la mayor extracción, luego le sigue a 20 minutos y la menor extracción a 15 minutos, estos resultados son coherentes con los hallados por (Quitain, Ozturk, Mission y Sasaki, 2017), quienes extrajeron alcaloides específicamente oximatrina de *Sophora flavescens* logrando mayor extracción a 15 minutos, siendo una de las condiciones óptimas.

b. Extracción asistida por biorreactor (convencional)

La figura 3, pone de manifiesto que, cuando hay mayor agitación, se logra una mayor extracción de los alcaloides, es así que a 120 RPM se tiene 0,850 % de alcaloides quinolizidínicos residuales, este resultado tiene coherencia ya que en esta condición hay mayor interacción entre el agua y las partículas de tarwi, favoreciendo la transferencia de masa de alcaloides hacia el agua; estadísticamente existe diferencias entre los niveles de agitación, por lo que a 120 RPM es el parámetro de extracción por el método convencional con el biorreactor. Analizando la figura 4, se puede apreciar que la condición óptima de extracción por el método convencional con el biorreactor es a 120 RPM por 12 horas, se puede observar la relación inversa entre la agitación y la cantidad de alcaloides residuales, también existe un comportamiento particular entre tiempo y potencia, como se puede estimar que a la mayor agitación se tiene una mayor extracción en los menores tiempos, sin

embargo conforme la agitación disminuye, se logra mayores extracciones a mayores tiempos. Se puede afirmar para el modelo que solamente el que genera diferencia significativa es la agitación.

c. Extracción asistida por ultrasonido a 40 kHz

La figura 5, visualiza una mayor extracción de alcaloides a la energía ultrasónica de extracción intermedia que para el trabajo corresponde 50 % con 1,643 % de alcaloides residuales, estadísticamente existe diferencias entre los niveles de energía ultrasónica, por lo que a 50 % de energía ultrasónica a 40 kHz, es el parámetro de extracción asistida por microondas; esto se puede explicar en la medida que cuando aumenta la temperatura aumenta la cavitación, hasta un límite aproximado de 50 °C que se logra al 50 % de la energía ultrasónica, pero cuando se supera ese umbral hay una caída de presión dentro de la matriz lo que genera una disminución de los efectos sonoquímicos (Lavilla y Bendicho, 2017). Analizando la figura 6, se puede apreciar que la condición óptima de extracción es a 50 % de energía ultrasónica a 40 kHz por 10 minutos, se puede ver que existe una tendencia de mayor extracción a la potencia ultrasónica intermedia a los diferentes tiempos y menores extracciones a las potencias menores y mayores a los diferentes tiempos. Si se realiza una comparación entre la extracción de alcaloides asistida por microondas y ultrasonido, se puede apreciar que el microondas tiene mayor capacidad de extracción, lo que concuerda con los hallazgos realizados por (Gao & Liu, 2005).

5. Conclusiones

- La relación que existe entre la potencia de extracción asistida por microondas y el contenido de alcaloides quinolizidínicos, es inversa, teniendo la mayor extracción de 0,909 % residual a 600 watts.
- Con la potencia ultrasónica intermedia evaluada, se obtiene la mayor extracción de alcaloides quinolizidínicos 1,643 % residual, a 50 % de potencia ultrasónica con frecuencia de 40 kHz.
- Existe relación directa entre la agitación y la extracción de alcaloides quinolizidínicos, se obtiene 0,85 % con 120 R.P.M.

Contribución de los autores: Autor 1 realizó los experimentos y procesamiento de los datos. Autor 2 la redacción del artículo y búsqueda de artículos científicos relacionados al trabajo. Autor 3 realizó la extracción asistida por microondas y la toma de datos. Autor 4 realizó la extracción con el biorreactor y la toma de datos. Autor 5 realizó la extracción asistida por ultrasonido y la toma de datos. Todos los autores realizaron la determinación de alcaloides.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

6. Referencias bibliográficas

- Angurel I., Casamitjana N., Caubet A., Dinares I., Llor N., Muñoz-Torrero D.,..., Velasco D. (s.f.). *Operaciones básicas en el laboratorio de química*. Universitat de Barcelona.
- Baer D., Reimerdes E. H. & Feldheim W. (1979). Methoden zur Bestimmung der Chinolizidinalkaloide in *Lupinus mutabilis*. Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung, 169(1), 27–31. doi:10.1007/bf01353410
- Castillo R. (1979). *Extracción y caracterización de extracto etéreo de tarwi*. Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Elez G. I., Dragović-Uzelac V., Režek J. A., y Jukić, M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, (117) 4: 437–442. doi: 10.1016 / j. jfoodeng.2012.12.043
- Gaete-Garretón L., Vargas-Hernández Y., Cares-Pacheco M. G., Sainz J., y Alarcón J. (2011). Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from *Quillaja saponaria* Molina. *Ultrasonics*, (51) 5: 581–585. doi: 10.1016 / j. ultras.2010.12.012
- Gao M. & Liu C.-Z. (2005). Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (21) 8-9: 1461–1463, doi:10.1007/s11274-005-6809-1
- Hatzold T., Elmadfa I., Gross R., Wink M., Hartmann T. y Witte L. (1983). Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem.* (31) 5: 934–938. doi: 10.1021 / jf00119a003
- Khoddami A., Wilkes M., y Roberts T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18 (2), 2328–2375. doi: 10.3390 / molecules18022328
- Lara K. (1999). *Estudio de alternativas para el desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)*. Tesis de doctorado en química. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Ecuador.
- Lavilla I., y Bendicho C. (2017). Fundamentals of ultrasound-assisted extraction. *Water Extraction of Bioactive Compounds – from Plants to Drug Development*, Chapter 11. Editores: Herminia Dominguez González y María Jesús González Muñoz 291–316. doi: 10.1016 / b978-0-12-809380-1.00011-5
- Lovrić V., Putnik P., Bursać K. D., Jukić M., ..., Dragović-Uzelac V. (2017). Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technol. Biotechnol.*, (55) 2: 243-250. doi: 10.17113 / ftb.55.02.17.4687
- Quitain A.T., Ozturk B., Mission E.G. y Sasaki M. (2017). Microwave-assisted pressurized hot water Extraction of Alkaloids. *Water Extraction of Bioactive Compounds – from Plants to Drug Development*, Chapter 10. Editores: Herminia Dominguez González y María Jesús González Muñoz 269–289. doi: 10.1016 / b978-0-12-809380-1.00010-3
- Sosa C. (2000). *Influencia de dos métodos de extracción de un aislado proteico de lupino (*L. mutabilis*) en sus propiedades funcionales*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Torres-Tello F. (1976). *Lupinus mutabilis* Sweet -a potent food source from the Andean region. *Journal of Clinical Nutrition* 29:933.
- Vinatari M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8: 303-313.
- Wang L. y Weller C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6), 300–312. doi: 10.1016 / j.tifs.2005.12.004
- Zhu X., Su Q., Cai J. y Yang J. (2006). Optimization of microwave-assisted solvent extraction for volatile organic acids in tobacco and its comparison with conventional extraction methods. *Analytica Chimica Acta*, 579 (1), 88–94. doi: 10.1016 / j.aca.2006.07.005