

Conference Paper

Quantification By Gas Chromatography of the Content of Amino Acids Present in Sausages Fortified with Quinoa Vegetable Protein

Cuantificación por Cromatografía de Gases del Contenido de Aminoácidos Presentes en Embutidos Fortificados con Proteína Vegetal de Quinoa

A. Zavala¹, M. González², and P. Pino²

¹Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

²Docente – Investigador, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

*International Seminar of
Livestock and Agroindustrial
Production ESPOCH 2020*

Corresponding Author:

A. Zavala

alicia.zavala@epoch.edu.ec

Published: 2 September 2021

Production and Hosting by
Knowledge E

© A. Zavala et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract

The objective of this research was to determine the quality of the protein present in sausages fortified with quinoa as a substitute for animal protein, through the identification and quantification of amino acids, using gas chromatography and precolumn derivatization. The amino acid composition found in the analyzed products was predominantly composed of: Threonine (THR) with a concentration of 1046.32 μmol / L, aminobutyric acid (ABA) with a concentration of 9685.68 μmol / L and glutamic acid (GLU) with a concentration of 1178.71 μmol / L. These values were found in the treatment with the highest percentage of quinoa flour, establishing a directly proportional relationship between the concentrations of these amino acids and the percentage of quinoa. Gas chromatography was an adequate technique for determining the amino acid profile due to its speed and sensitivity.

Keywords: *amino acids, sausages, quinoa, derivatization, gas chromatography.*

Resumen

La presente investigación tiene por objetivo determinar la calidad de la proteína presente en embutidos fortificados con quinoa como sustituyente de la proteína animal, a través de la identificación y cuantificación de aminoácidos mediante la aplicación de cromatografía de gases y la derivatización precolumna. La composición de aminoácidos encontrada en los productos analizados destaca la presencia mayoritaria de: Treonina (THR) con una concentración de 1046,32 μmol/L, ácido aminobutírico (ABA) con una concentración de 9685,68 μmol/L y ácido glutámico (GLU) con una concentración de 1178,71 μmol/L, todos estos valores se presentaron en el tratamiento con mayor porcentaje de harina de quinoa estableciéndose una relación directamente proporcional entre las concentraciones de estos aminoácidos y el porcentaje de adición de quinoa en los tratamientos estudiados. Se puede concluir que la cromatografía de gases empleada resultó una técnica adecuada para la determinación del perfil aminoacídico por la rapidez y sensibilidad presentada sobre las muestras estudiadas.

Palabras Clave: *aminoácidos, embutidos, quinoa, derivatización, cromatografía de gases.*

 OPEN ACCESS



1. Introducción

El desarrollo y diferenciación de los derivados cárnicos va de la mano con el incremento del interés que presentan los consumidores hacia el mantenimiento de su salud [1]. Los productos cárnicos poseen un valor nutricional importante para ciertas funciones del organismo; sin embargo, algunos de sus componentes pueden afectar de manera negativa a la salud de los consumidores. Uno de los componentes que pueden alterar de manera significativa el equilibrio nutricional de la dieta es el porcentaje de grasa presente en los derivados cárnicos que se ha determinado entre 20 a 40% del total del peso [2]. En los productos cárnicos, el contenido de aminoácidos libres y ácidos grasos libres son dos parámetros importantes que se utilizan para establecer su calidad. Estos compuestos juegan un papel muy importante en la definición de las características sensoriales y la aceptabilidad de los productos cárnicos [3].

Este problema nutricional en los derivados cárnicos ha sido solucionado a través de la utilización de derivados proteicos de origen vegetal disminuyendo no sólo el índice de grasa sino incrementando la presencia de proteína en el producto final, al mismo tiempo que se incrementa el rendimiento y se disminuyen los costos de formulación [4, 5].

Los diversos análisis de la composición nutricional de la quinua la han posicionado como un superalimento gracias a su elevado contenido de macronutrientes, además de la presencia de aminoácidos esenciales, grasas poliinsaturadas, fibra dietética, vitaminas y minerales [6]. El contenido proteínico de la quinua es mayor que en los demás granos comerciales, siendo un 10,4 al 17% superior. Esta proteína posee aminoácidos esenciales como histidina y lisina, los mismos que en los demás cereales son limitantes [6]. Todos estos aspectos analizados hacen de la quinua un producto atractivo para su aplicación tecnológica en la elaboración de alimentos con alto contenido proteínico y por ende elevado potencial nutricional [7].

Los aminoácidos presentes en la composición nutricional de la quinua son componentes esenciales de una gran cantidad de productos industriales, farmacéuticos y agrícolas. Existen diversidad de métodos analíticos empleados para la determinación de este tipo de compuestos orgánicos, siendo la determinación por cromatografía de gases uno de los más empleados. Este procedimiento es rápido, posee un elevado poder de sensibilidad y resolución, sin embargo, como los aminoácidos libres no son compuestos suficientemente volátiles requieren de un proceso de derivatización a ésteres de aminoácidos para poder determinarlos [8].

La determinación de aminoácidos posee una amplia aplicación a nivel investigativo y tecnológico siendo uno de los más importantes el poder establecer el valor nutritivo de productos destinados a la alimentación. El incremento del interés del consumidor por obtener información relacionada con el valor nutritivo de los productos ha llevado a desarrollar nuevos métodos más precisos y sensibles. De igual manera, se observa un incremento en el desarrollo de procesos para la detección de adulteraciones en alimentos o la determinación de aminoácidos, péptidos o derivados potencialmente tóxicos producidos.



Tradicionalmente, el método más común para analizar aminoácidos en matrices de alimentos ha sido la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) con un paso de derivación de columna previa [9]. La Cromatografía de gases se puede utilizar como un método alternativo, especialmente cuando las cantidades de muestras requieren una sensibilidad alta [10]. Además, GC presenta una mayor resolución y velocidad de análisis y costo instrumental que HPLC [11]. La búsqueda de métodos nuevos y precisos para el análisis de aminoácidos en carne y productos cárnicos es un reto. La derivación y la cromatografía son procedimientos que se han estudiado a fondo, y se a dado menos atención a los métodos de extracción [12]. Recientemente Jiménez-Martin *et al.* [9] describió un método GC para la determinación de aminoácidos libres en los alimentos de origen animal. En esta metodología, la muestra se homogeniza con HCl 0,1 M mediante el uso de un digestor. El acetonitrilo se utiliza para desproteínizar. La aplicación de este método GC para la determinación de aminoácidos en la carne y los productos cárnicos constituyen una importante reducción del tiempo y gasto de disolventes en los procedimientos de separación y detección en comparación con RP-HPLC con el método del detector de matriz de diodos [13, 14].

El criterio para seleccionar el método más apropiado en la cuantificación de aminoácidos dependerá de aspectos como la resolución, sensibilidad y velocidad del método. El objetivo central de la presente investigación es cuantificar el contenido y establecer el perfil de aminoácidos de embutidos fortificados con quinua como proteína vegetal, a través de un procedimiento cromatográfico de columna reversa con derivatización pre-columna [15].

2. Materiales y Métodos

2.1. Material e instrumentación

En el estudio se llevó a cabo un muestreo aleatorio dirigido. Se recolectaron 3 muestras al azar de chorizo y 3 muestras al azar de Jamón una por cada tratamiento, las mismas que fueron elaboradas en el Laboratorio de Cárnicos de la Facultad de Salud Pública para luego ser analizadas en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH.

Fueron estudiados 3 niveles en cada uno de los embutidos: Q0 (Tratamiento control), Q1 (tratamiento 5% de harina de quinua) y Q2 (tratamiento 7,5% de harina de quinua). La asignación de las concentraciones se realiza mediante el cálculo de una curva de calibración establecida por el CG.

Cada una de las muestras tanto el tratamiento control como los embutidos enriquecidos con harina de quinua fueron analizados directamente; todos los pasos, incluida la limpieza de muestras, la derivación y el análisis se realizaron como se describe la tabla del manual del equipo [16]; no se realizó ninguna preparación de muestra adicional antes de EZ: Análisis de faast.



2.2. Patrones

Se utilizaron kits fisiológicos EZ: Faast para GC-FID (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.)

2.3. Medio de elución

El volumen del medio de elución preparado depende del número de muestras que se analizarán durante el día (200 ul/muestra) por lo cual se debe realizar minutos antes de ejecutar el análisis. La combinación del medio de elución consiste en colocar 3 partes de reactivo 3a (componente medio de elución 1) con 2 partes de reactivo 3b.

2.4. Método de derivatización

De manera inicial se realizó una dilución con agua destilada de 1 g de muestra en 100 µL de agua. En cada vial se procedió a mezclar 100 µL de dilución con 100 µL de reactivo 1 (solución estándar interno), posteriormente se pipetearon 200 µL de reactivo 2 (solución de lavado) en el mismo vial. Se colocaron 200 µL del medio de elución en el vial que contenía la muestra [14, 17].

Con la ayuda de un microdispensador (dialamatico drummond) se transfirieron 50 µL de reactivo 4 al vial de preparación de muestra y se procedió a emulsionar el líquido en el vial agitándolo repetidamente de 5–8 sec. El paso de emulsificación es efectivo cuando el contenido del vial se vuelve lechoso. Luego de 1 min se observó que la emulsión se separa gradualmente en dos capas. Se transfirió con el microdispensador 100 µL de reactivo 5 y se homogenizó aproximadamente 5 sec. Para finalizar se pipeteó 100 µL de reactivo 6 observando la separación de la capa orgánica que contiene derivados de aminoácidos. Esta capa fue transferida a un vial para proceder a la inyección manual en el equipo CG obteniendo los diferentes cromatogramas [17].

2.5. Condiciones cromatográficas

Todos los análisis se realizaron en el Equipo de Marca PERKIN ELMER CLARUS 580 con un detector de ionización de llama (FID) e inyección manual (1 µL) usando una jeringa SGE de 1 µL. Se trabajó en una columna GC capilar Zebron ZBAAA de 10 m × 0,25 mm. El programa de temperatura del horno de columna se desarrolló a 35°C por min de 110 a 320°C. La temperatura del detector FID fue de 320°C y se inyectó 1 µL a una temperatura de inyección de 250°C y un nivel dividido de 1: 2. El gas portador H₂ a una presión de 7 psi (un caudal de 1 µL/min). El caudal, presión y relaciones divididas fueron ajustadas según las especificaciones del instrumento de GC mediante la utilización de un software denominado CHOMERA el mismo que permite visualizar las condiciones necesarias para empezar el trabajo de análisis; las condiciones de análisis estándar se usaron como se describe en el manual del Kit [16].



3. Resultados y Discusion

En la Tabla 1 se puede observar la composición aminoacídica de Jamón fortificado con harina de quinua en comparación con el tratamiento testigo. Los aminoácidos que se presentan en mayor cantidad son ACIDO GLUTAMICO, TREONINA, ACIDO AMINOBUTIRICO.

Table 1

Concentración de aminoácidos en Jamón detectados por CG (Laboratorio de Bromatología – ESPOCH).

AMINOACIDO	TQ0 (Tratamiento testigo)		TQ1 (5% De harina de quinua)		TQ2 (7,5% Harina de quinua)	
	Concentración $\mu\text{mol/L}$	Porcentaje (%)	Concentración $\mu\text{mol/L}$	Porcentaje (%)	Concentración $\mu\text{mol/L}$	Porcentaje (%)
GLY	69,86	9,88	121,37	2,80	409,56	11,77
ABA	63,27	8,95	617,84	14,27	513,44	14,75
BAIB	73,27	10,36	335,25	7,74	371,35	10,67
VAL	78,26	11,07	0,00	0,00	175,34	5,04
ALA	122,59	17,34	672,15	15,52	168,52	4,84
SER	0,00	0,00	180,74	4,17	0,00	0,00
ASP	0,00	0,00	12,12	0,28	165,55	4,76
LEU	55,51	7,85	0,00	0,00	112,51	3,23
MET	21,10	2,98	80,53	1,86	93,34	2,68
GLU	0,00	0,00	523,99	12,10	700,65	20,13
PHE	40,45	5,72	75,48	1,74	75,82	2,18
AAA	85,22	12,05	209,35	4,83	273,09	7,85
LIS	62,91	8,90	86,02	1,99	23,68	0,68
AILE	0,00	0,00	132,19	3,05	0,00	0,00
ILE	0,00	0,00	0,00	0,00	57,60	1,65
THR	0,00	0,00	1107,85	25,58	195,42	5,61
HIS	34,62	4,90	112,36	2,59	60,40	1,74
ORN	0,00	0,00	63,68	1,47	71,08	2,04
TYR	0,00	0,00	0,00	0,00	13,34	0,38

La Tabla 2, muestra los resultados obtenidos para el perfil aminoacídico de chorizo elaborado con diferentes porcentajes de harina de quinua Q1 y Q2 comparándolo con el tratamiento testigo Q0.- Los mayores porcentajes de concentración fueron para ACIDO GLUTAMICO, TREONINA, ACIDO AMINOBUTIRICO.

En las Tablas 3 y 4 se reflejan los análisis estadísticos obtenidos a partir de la cuantificación de la concentración de aminoácidos presentes en jamón y chorizo enriquecido con harina de quinua. Un valor F suficientemente grande indica que el término o el modelo es significativo, si el valor p presenta valores más bajos proporciona una evidencia más fuerte en contra de la hipótesis nula.

**Table 2**

Concentración de aminoácidos en Chorizo detectados por CG (Laboratorio de Bromatología – ESPOCH).

AMINOACIDO	TQ0 (Tratamiento testigo)		TQ1 (5% De harina de quinua)		TQ2 (7,5% Harina de quinua)	
	Concentración $\mu\text{mol/L}$	Porcentaje (%)	Concentración $\mu\text{mol/L}$	Porcentaje (%)	Concentración $\mu\text{mol/L}$	Porcentaje (%)
GLY	11,32	2,45	98,29	3,62	172,63	0,98
ABA	125,96	27,22	1352,26	49,81	9666,39	54,98
BAIB	50,39	10,89	210,62	7,76	2826,27	16,08
VAL	0,00	0,00	61,99	2,28	516,53	2,94
ALA	0,00	0,00	56,56	2,08	80,71	0,46
SER	40,61	8,77	0,00	0,00	406,37	2,31
ASP	11,10	2,40	186,75	6,88	446,38	2,54
LEU	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MET	0,00	0,00	14,21	0,52	59,37	0,34
GLU	120,43	26,02	353,69	13,03	1177,80	6,70
PHE	7,75	1,68	14,25	0,53	274,95	1,56
AAA	42,92	9,27	98,38	3,62	401,17	2,28
LIS	39,26	8,48	51,19	1,89	86,96	0,49
ILE	0,00	0,00	0,00	0,00	133,13	0,76
ILE	0,00	0,00	73,35	2,70	90,81	0,52
THR	0,00	0,00	91,90	3,39	1051,27	5,98
HIS	13,09	2,83	47,66	1,76	67,07	0,38
ORN	0,00	0,00	3,64	0,13	122,83	0,70
TYR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Table 3

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo correspondiente a la cuantificación de aminoácidos para Jamón fortificado con harina de quinua (Q1, Q2) y tratamiento testigo (Q0).

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad (p)	Valor crítico para F
Aminoácido	3368567,77	18	187142,654	1077,8643	2,371×10 ⁻¹¹⁸	1,69502547
Tratamiento	1134121,12	2	567060,562	3266,03436	2,277×10 ⁻¹⁰¹	3,07585264
Interacción	3513690,84	36	97602,5233	562,150175	9,412×10 ⁻¹¹³	1,52072918
Dentro del grupo	19793,0876	114	173,623575			
Total	8036172,82	170				

La Figura 1 describe la concentración de aminoácidos encontrada se destacan como mayoritarios los aminoácidos: L- aminobutírico, ácido glutámico y aminoácidos aromáticos como la valina, isoleucina, leucina y fenilalanina.



Table 4

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo correspondiente a la cuantificación de aminoácidos para Jamón fortificado con harina de quinua (Q1, Q2) y tratamiento testigo (Q0).

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad (p)	Valor crítico para F
Aminoácidos	3368567,78	18	187142,654	1077,8643	2,371×10 ⁻¹¹⁸	1,69502547
Tratamientos	1134121,12	2	567060,562	3266,03436	2,277×10 ⁻¹⁰¹	3,07585264
Interacción	3513690,84	36	97602,5233	562,150175	9,412×10 ⁻¹¹³	1,52072918
Dentro del grupo	19793,0876	114	173,623575			
Total	8036172,83	170				

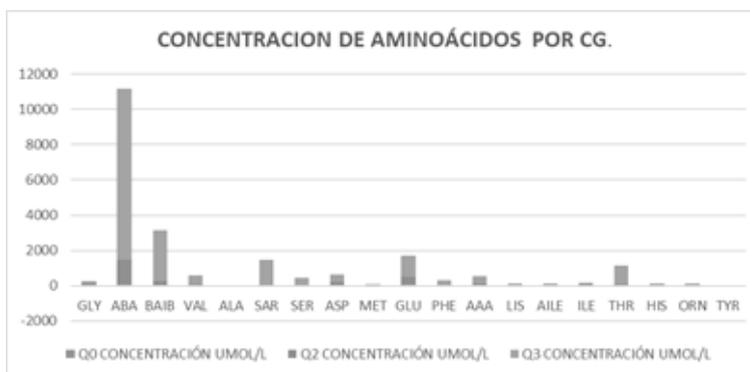


Figure 1

Concentración de aminoácidos detectados por CG para cada tratamiento.

4. Discusión

De acuerdo con los resultados expuestos en Tabla 1 para muestras de Jamón fortificado se evidencia un incremento en su porcentaje de Q0 a Q1 y Q2 para Acido aminobutírico, el Ácido Glutámico fue detectable en Q1 y Q2, en Treonina se visualiza un incremento en porcentaje, se evidencia que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de aminoácidos y el porcentaje de adición de harina de quinua. Estos resultados coinciden con hallazgos descritos en estudios previos en donde se muestra a la glutamina como el principal aminoácido en la carne fresca [18]. En relación con el triptófano, se ha detectado en baja concentración en carne fresca [19]. Según los resultados encontrados por Jimenez-Martín *et al.* [13], el ácido glutámico es el principal aminoácido en el cerdo fresco, seguido por la glutamina, la cisteína y la fenilalanina y de acuerdo al presente estudio se evidencia un alto porcentaje de ácido glutámico lo que correlaciona la investigación con estudios anteriores.

En la Tabla 2 para muestras de chorizo fortificado se evidencia que el Ácido amino butírico incrementa un 22,59% entre el tratamiento Q0 y Q1 mientras que el incremento de Q1 y Q2 es de 5,17%, en el ácido glutámico se visualiza un descenso en su porcentaje



se puede deber a la presencia de Interferencias en la aplicación del método; en Treonina Q0 no es detectable mientras que en los tratamientos Q1 y Q2 presento un incremento de 2,59%. Estudios indican que la determinación de la calidad de la proteína depende de la concentración de aminoácidos esenciales. Estudios realizados demuestran que la quinua, contiene mayor cantidad de lisina (81 mg/g de proteína) que la proteína de huevo (70 mg/g de proteína) [6]. De igual manera, se puede mencionar que los aminoácidos son componentes importantes de los alimentos, constituyéndose en los precursores de la biosíntesis de proteínas. A su vez, el contenido de aminoácidos contribuye de manera directa al sabor de los alimentos y algunos son determinantes en el aporte de aromas por ejemplo durante la reacción de Maillard. En nuestro estudio es importante señalar que la presencia de aminoácidos influye directamente en ciertos procesos de fermentación y maduración de alimentos [16, 20].

Se puede evidenciar el incremento de ciertos aminoácidos esenciales como ABA, BAIB, SAR, GLU y THR. Por el contrario, la Tirosina no fue detectable por este método, debido a que es sintetizado a partir de la hidroxilación de la fenilalanina siempre y cuando la contenga un aporte adecuado de este aminoácido. Con base en los resultados también se puede determinar que la concentración de PHE es mínima lo que pudo ocasionar que no sea hidroxilado [12, 19]. Los dos tipos de embutidos elaborados tienen en común la presencia de harina de quinua, que es un cereal catalogado como fuente importante de proteínas debido a su digestibilidad y su composición equilibrada en aminoácidos esenciales [21]. La quinua contiene un nivel proteico superior otros cereales comunes como la sémola de trigo, las proteínas de la quinua están formadas principalmente por albúmina y globulina que poseen un excelente porcentaje de lisina en su composición [22].

La cantidad elevada de proteínas que puedan presentar las harinas de uso común para la elaboración de embutidos no significa que cuenten con todos los aminoácidos esenciales, el ácido glutámico, treonina y ácido aminobutírico cuantificados en el presente estudio, normalmente se encuentran en cantidades limitadas en los cereales comunes [22, 23]. El contenido de ácido glutámico (GLU) fue diferente en los dos embutidos analizados ($p < 0,05$), siendo el jamón el que mostró el mayor valor en el tratamiento Q3 con una concentración de 699,02 $\mu\text{mol/L}$. La lisina (LYS) es el aminoácido de mayor estudio e importancia en la composición nutricional de harinas y pastas alimenticias [23, 24], en el estudio se presentan en los dos embutidos un porcentaje de 1,99% de lisina mientras que en los cereales comunes esta se encuentra en cantidades inferiores a las requeridas para la nutrición humana [25]. Estos datos obtenidos demuestran la importancia de la adición de la proteína vegetal de harina de quinua en la elaboración de embutidos permitiendo aportar mayor calidad nutricional y en particular de aminoácidos esenciales como el ácido glutámico, treonina y lisina.

Una vez realizadas las pruebas de ANOVA para los embutidos jamón (Tabla 3) y chorizo (Tabla 4) se demostró a través de la determinación de probabilidad que existían diferencias altamente significativas en los tres tratamientos analizados Q0, Q1 y Q2, siendo el valor de p para los dos casos menor a 0,05 (Tablas 3 y 4). De igual manera se establecieron los valores de F para ambos tratamientos siendo mayores que su valor crítico por lo que se establece el incremento del porcentaje de harina de quinua desde



0% del tratamiento testigo al 7,5% del tratamiento Q2 marca la diferencia en cuanto al contenido de aminoácidos presentes en las muestras de jamón y chorizo fortificados [26].

5. Conclusiones

- La Incorporación de la harina de quinua dentro de la formulación de los embutidos fortificados es una alternativa de alimento con calidad. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran el potencial que tiene la harina de quinua en la elaboración de embutidos y el respectivo incremento de rentabilidad al ser factible reemplazar proteína animal por proteína vegetal.
- Se evidencio un incremento de la concentración de aminoácidos esenciales como Treonina y Acido Amino Butírico, que se demuestra a través del análisis estadístico en donde existe diferencias significativas ($p < 0,05$). De igual manera el tratamiento estadístico demuestra una relación directamente proporcional entre la concentración de aminoácidos y el porcentaje de adición de harina de quinua.

References

- [1] Peña et al. Desarrollo de productos cárnicos funcionales: utilización de harina de quinua. *Alimentos, Ciencia e Investigación*. 2015; 23:21-26.
- [2] Totosa A. Productos cárnicos emulsionados bajos en grasa y sodio. *Nacameh*. 2007;1:53-66.
- [3] Sánchez F, Jiménez F, Olmedilla B. Derivados cárnicos funcionales: Estrategias y perspectivas. 1st edition. Madrid: Fundación Española de nutrición; 2005.
- [4] Price J. Ciencia de la carne y producto carnico. 2nd edition. España: 1994
- [5] FAO. Valor Nutricional de la Quinoa. International Year of Quinoa Secretariat; 2013.
- [6] Romo S, Rosero A, Forero C, Cerón E. Potencial nutricional de harinas de quinua (*Chenopodium quinoa* W) variedad piartal en los andes colombianos primera parte. *Revista Unicauca*. 2006
- [7] Callejón R. Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales [Tesis doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2014.
- [8] Jimenez-Martin E, Ruiz J, Perez-Palacios T, Silva A, Antequera T. Gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of free amino acids as their dimethyl-tertbutylsilyl (TBDMS) derivatives in animal source food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(10):2456– 2463.
- [9] Duncan MW, Poljak A. Amino acids analysis of peptides and proteins on the femtomole scale by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1998;70(5):890–896.
- [10] Silva BM, Casal S, Andrade PB, Seabra RM, Oliveira MB, Ferreira MA. Development and evaluation of a GC/FID method for the analysis of free amino acids in quince fruit and jam. *Analytical Sciences*. 2003;19(9):1285–1290.
- [11] Gehrke CW, Leimer K. Trimethylsilylation of amino acids derivatization and chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1971;57:219–238.
- [12] Martín L, Antequera T, Ventanas J, Benítez-Donoso R, Córdoba JJ. Free amino acids and other non-volatile compounds formed during processing of Iberian ham. *Meat Science*. 2001;59(4):363–368.
- [13] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis. Arlington: AOAC International; 2000.
- [14] Mustafa A, Aman P, Andersson R, Kamal-Eldin A. Analysis of free amino acids in cereal products. *Food Chemistry*. 2007;105(1):317–324.
- [15] Phenomenex E. User guide, Phenomenex. USA: Phenomenex; 2003.
- [16] Leggio A, Belsito EL, de Marco R, Liguori A, Siciliano C, Spinella M. Simultaneous extraction and derivatization of amino acids and free fatty acids in meat products. *Journal of Chromatography A*. 2012;1241:96–102.



- [17] Cornet M, Bousset J. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Science*. 1999;51(3):215–219.
- [18] Cordoba JJ, Antequera T, Ventanas J, Lopez-Bote C, Garcia C, Asensio MA. Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of iberian ham. *Meat Science*. 1994;37(2):217–227.
- [19] Alfocea F et al. Cuantificación por HPLC del contenido de aminoácidos presentes en el FITOMAS-E sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. *ICIDCA*;2011.
- [20] Danelli D, de Melo LM, Flôres SH, Jong EV. Chemical analysis of quinoa flakes: Characterization for use in food products. *Braz. J. Food Technol.* 2012;15(4):280-287.
- [21] Mao X, Hua Y, Chen G. Amino Acid composition, molecular weight distribution and gel electrophoresis of walnut (*Juglans regia* L.) proteins and protein fractionations. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15:2003-2014.
- [22] Gil-Hernández A. Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2nd edition. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
- [23] Perkin Elmer Instruments. User Guide of AutoSystem XL GC IPM. Connecticut: Shelton; 2006.
- [24] Maldonado P. Elaboración de embutidos fortificados con proteína vegetal a base de quinua (*Chenopodium quinoa* wild). *Enfoque UTE*. 2010; [citado 08 agosto 2020]; Disponible en: <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v1n1.15>
- [25] Restrepo J. Validación de un método cromatográfico para evaluar la calidad proteica de alimentos y su impacto en los niveles plasmáticos. *Revista de ciencias*. 2019; [citado 09 de agosto 2020]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.25100/rc.v23i1.8621>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967312005869?via%3Dihub>