

Aislamiento de proteínas de quinua ecuatoriana (*Chenopodium quinoa Willd*) variedad INIAP Tunkahuan con remoción de compuestos fenólicos, para uso potencial en la nutrición y salud humanas

Iván L. Tapia C.¹, Darwin R. Taco¹, Verónica J. Taco. T^{1*}.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito

Rev Fac Cien Med (Quito), 2016; 41 (1): 71-80

Recibido: 03/03/16; Aceptado: 14/03/16

Correspondencia:

Verónica Taco,

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito

vjtaco@uce.edu.ec

Resumen

Contexto: la quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) es un alimento de alto potencial en la alimentación humana por su valor nutricional y alta calidad proteica.

Objetivo: estudiar diferentes procedimientos de aislamiento de proteínas de la harina integral de quinua ecuatoriana (variedad INIAP Tunkahuan).

Métodos: el aislamiento de proteínas se realizó por precipitación isoeléctrica con y sin remoción de compuestos fenólicos, que podrían oscurecer el aislado proteico e influir en su digestibilidad. A partir de la harina de quinua seca y desengrasada (tamaño de partícula 0,27 mm), se solubilizó el contenido proteico a pH alcalino (11,0), luego se realizó una precipitación a pH ácido (5,0). La remoción de compuestos fenólicos se efectuó usando tratamiento ácido previo (pH 4,5). Para evaluar su potencial tecnológico, en el aislado se cuantificó la proteína total, proteína soluble y compuestos fenólicos, además se obtuvo el perfil electroforético por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida – sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE).

Resultados: la quinua analizada tiene un contenido proteico de $14,15 \pm 0,28$ %; el aislado presentó cantidades de proteína total y soluble de $70,10 \pm 0,77$ % y $66,96 \pm 0,79$ mg BSA/mL respectivamente, resultados independientes del procedimiento de extracción. El tratamiento ácido previo removió notablemente los compuestos fenólicos, no se alteró la cantidad de proteínas aisladas ni el tipo de proteínas extraídas, siendo éstas en su mayoría albúminas (66kDa) y globulinas (55 kDa).

Conclusión: el aislado proteico de quinua es un ingrediente prometedor y altamente nutritivo con potencial para suplementos alimenticios de alto valor agregado.

Palabras clave: quinua, aislado proteico, remoción compuestos fenólicos, precipitación isoeléctrica, perfil electroforético

Abstract

Background: quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) has high potential in human nutrition since it is a nutrient – dense food with high quality protein.

Objective: to study different processes for protein isolation of quinoa whole grain flour from Ecuador (variety INIAP Tunkahuan), which is highly produced in this country due to its wealth in saponins.

Design: the protein isolate of quinoa was made by isoelectric precipitation with and without removal of phe-



nolic compounds; these may lead to undesirable effects such as darkening in the protein isolate and affect its digestibility. Degreased quinoa flour (particle size 0,27 mm) was solubilized into protein content to alkaline pH (11,0), then, precipitation was made to acid pH (5,0). The removal of phenolic compounds was made by using acid pre-treatment (pH 4,5). The protein content, soluble protein and phenolic compounds were quantified. Electrophoretic profile was obtained by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),

Results: it was found out that INIAP Tunkahuan quinoa's protein content was $14,15 \pm 0,28$ %, and the amount of total and soluble protein in the isolate was $70,10 \pm 0,77$ % y $66,96 \pm 0,79$ mg BSA/mL respectively, these results were independent from the extraction process. The acid pre-treatment removed significantly the phenolic compounds, the quantity of isolated protein neither the type of proteins extracted was altered and these proteins were mostly albumins (66kDa) and globulins (55 kDa).

Conclusions: quinoa protein isolate is a promising and highly nutritious ingredient with potential for high added value food supplements.

Keywords: quinoa, protein isolate, phenolic compounds removal, isoelectric precipitation, electrophoretic profile.

Introducción

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), pseudocereal perteneciente a la subfamilia *Chenopodioideae* de las amarantáceas que se ha cultivado desde tiempos incaicos en la cordillera de los Andes, es considerado de gran potencial en la alimentación humana^{1,2} debido a su alto valor nutricional,³ principalmente por su elevada calidad proteica, contenido de minerales y vitaminas.⁴ Ha sido estudiado como fuente de compuestos bioactivos que promueven la salud tales como flavonoides,^{5,6} y los fitoecdisteroides encontrados muestran una alta gama de efectos farmacológicos beneficiosos en los mamíferos.⁷

La quinua ecuatoriana, variedad INIAP Tunkahuan, se caracteriza por tener bajo contenido de saponinas (0,03%),⁸ compuestos amargos antinutricionales³ que han sido objeto de varios estudios.⁹

En los estudios de calidad proteica realizados por Bejosano y Corke, se determinó la composición de aminoácidos y la digestibilidad, - in vitro- de concentrados de proteína de harina integral de cinco genotipos de amaranto; y se demostró que la presencia de compuestos fenólicos influye en la digestibilidad de las proteínas, por lo cual deben ser eliminados.¹⁰ Por su parte, Gonzáles – Pérez y colaboradores desarrollaron un método para obtener un aislado de proteína de girasol no desnaturizada y libre de ácido clorogénico; en este estudio se eliminaron los compuestos fenólicos utilizando metanol acuoso antes de la extracción de proteínas.¹¹ En cuanto a las propiedades funcionales de la proteína, Marccone y

Kakuda realizaron un estudio comparativo de estas propiedades en aislados de globulina de amaranto y soya, que se centró en la solubilidad proteica, coagulación por calor, capacidad emulsificante, formación de espuma y estabilidad.¹² Por otro lado, Rubino y otros, con la finalidad de remover los compuestos fenólicos en la producción de aislados de proteína de alta calidad a partir de canola, estudiaron la influencia del ácido sinápico y el ácido tomasidioico sobre las características reológicas de geles de aislados proteicos de canola.¹³

La presencia de polímeros altamente coloreados en aislados proteicos de vegetales de debe fundamentalmente a la generación de productos de la reacción proteína – fenol;^{12,14} como se ha mencionado, esta interacción tiene efectos en la desnaturización térmica, solubilidad y digestibilidad de las proteínas.^{10,11,13} También, como ya se ha demostrado, en medio acuoso, los compuestos fenólicos pueden ligarse a las proteínas de varias formas como enlaces de hidrógeno, enlaces covalentes, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas. En medio alcalino, los compuestos fenólicos se oxidan rápidamente formando quinonas, éstas reaccionan con las proteínas y oscurecen la solución produciendo un color marrón (Sosulski, 1979). Son factores determinantes en la reacción proteína – fenol el valor de pH, niveles de oxígeno, tiempo y temperatura.¹⁰

Marccone observó que los aislados de amaranto fueron significativamente más oscuros respecto a los de soya,¹² esto podía deberse a la presencia de

taninos indeseables en tegumento de amaranto que precipitaron junto a la proteína en la extracción. En su investigación Xu (2002) evaluó varios procesos como la diafiltración, el tratamiento con NaCl 0,05 mol/L y la combinación de éstos para la remoción de los compuestos fenólicos; el Na₂SO₃ 0,1 % como agente reductor puede reducir los efectos de la oxidación sobre el flavour del producto, sin embargo se observa que son tratamientos excesivamente costosos, la remoción fue incompleta y se produjeron pérdidas de proteína, si bien la combinación de éstos redujo el contenido de compuestos fenólicos entre un 80 a 90%.¹⁴ Por otro lado, como lo demuestra L'Hocine los aislados proteicos de soja obtenidos mediante un pre - tratamiento ácido (lavado ácido previo a la extracción de proteína) mostraron mayor solubilidad al compararlo con el tratamiento control, esto puede deberse a la eliminación parcial de compuestos fenólicos durante el proceso de extracción.¹⁵ Finalmente Elsohaimy y colaboradores centraron su estudio en las condiciones óptimas de preparación del aislado de proteína de semillas de quinua e investigaron las propiedades físico - químicas y funcionales de la proteína aislada.¹⁶

Material y métodos

Preparación de la muestra: Se trabajó con un universo de estudio de cinco kilogramos de semillas certificadas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) ecuatoriana variedad INIAP Tunkahuan, baja en contenido de saponinas, marca comercial INAGROFA. Se tomaron sucesivas muestras que se homogenizaron por el método de cuarteo hasta obtener aproximadamente 500 gramos de semillas.¹⁷

Una vez obtenida la muestra representativa, ésta se desintegró mecánicamente en un molino Hamilton Beach Modelo 80365 (México) y con una serie de tamices Serie Tyler (números 9, 20, 35, 60, 80, 100, 250), además de una máquina vibradora, se clasificaron las partículas resultantes para determinar su diámetro promedio mediante la ecuación 1,¹⁸ en la que x_i representa la fracción retenida de la muestra en cada tamiz y el diámetro promedio de las partículas en el incremento.

Ecuación 1

Análisis proximal: se determinaron los porcentajes de humedad, cenizas, grasa, proteína total y fibra cruda de la harina de quinua empleando los mé-

todos de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos.¹⁹

Obtención de harina desengrasada: Para el desengrasado de la harina de quinua se usó la técnica de solubilidad y el método de extracción líquido/sólido. Se pesaron 10 gramos de harina de quinua que fue desengrasada en un aparato de Soxhlet, utilizando éter dietílico (grado analítico) a su temperatura de ebullición como disolvente de extracción, durante dos horas. Al terminar el proceso de extracción se eliminó el disolvente de la harina desengrasada, a temperatura ambiente, dentro de la campana de extracción de gases, durante 30 minutos.¹⁹

Aislamiento de proteínas: Para obtener el aislado proteico sin remoción de compuestos fenólicos (AP1) se solubilizó la harina de quinua desengrasada al 10% m/v en agua tipo I, se ajustó el pH de la disolución a 11,0 con NaOH 1N, con el fin de incrementar la solubilidad y favorecer la extracción de las proteínas de quinua, para esta operación se utilizó un pH-metro Mettler Toledo Modelo: S220 Serie: B351126640. Luego se agitó la disolución con un agitador Velp Scientifica Serie: 68470, durante 30 minutos y se centrifugó por 60 minutos a 2600 rpm a temperatura ambiente en una centrífuga Dynac Modelo: 0101 Serie: 11442. Se obtuvo un sobrenadante con las proteínas disueltas; con HCl 1 N se ajustó el pH a 5,0 (punto isoelectrico) para su precipitación. Esta mezcla se centrifugó durante 60 minutos a 2600 rpm y 4 °C. El precipitado obtenido se volvió a suspender en agua y se neutralizó con NaOH 0,1 N.

Para la obtención del aislado proteico de quinua con remoción de compuestos fenólicos (AP2) se utilizó un tratamiento ácido previo a la extracción de proteínas de quinua a pH alcalino. Para ello, la harina de quinua desengrasada se solubilizó al 10% m/v en agua tipo I, se ajustó el pH a 4,5 con HCl 1 N, se agitó por 60 minutos y luego se centrifugó en una centrífuga Dynac (Modelo 010, Serie 11442) a 2600 rpm, por 60 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvieron dos fracciones, una soluble con los compuestos fenólicos disueltos y otra insoluble. La fracción insoluble fue sometida a los procesos de extracción proteica a pH alcalino (11,0) y posterior precipitación a pH ácido (5,0) como se describió anteriormente.

Cuantificación de compuestos fenólicos en los aislados obtenidos: El contenido de compuestos fenólicos fue determinado por el método de Folin Cio-

calteu^{20,21} usando una curva de calibración de ácido gálico reactivo Sigma Aldrich, con concentraciones de 10 a 100 ppm.

El tratamiento de la muestra consistió en disolver 0,3 g del aislado proteico en 10 mL de metanol grado cromatográfico, disolución que se agitó por 30 minutos con un agitador Velp Scientifica Serie 68470. La mezcla obtenida fue filtrada con papel filtro cualitativo, mediantelavados de la porción insoluble con 10 mL de metanol grado cromatográfico. Se midieron 500 µL de los estándares y de las muestras AP1 y AP2 en tubos de ensayos, se agregó a cada uno 2,5 mL de reactivo de Folin Ciocalteu, se dejó en reposo por 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó 2 mL de una disolución de Na₂CO₃ de concentración 75 g/L, se agitó manualmente por cinco segundos e inmediatamente los tubos se incubaron por 15 minutos a 50 °C. Los tubos se enfriaron en un baño de agua a 4°C. Las absorbancias de muestras y estándares fueron leídas, por quintuplicado, en un espectrofotómetro UV-VIS MARA CARY MODELO 50-BIO, a una longitud de onda de 760 nm. El contenido de compuestos fenólicos se expresó en mg de ácido gálico/100 g muestra húmeda. Los resultados fueron contrastados usando la prueba t - student pareada con un $\alpha = 0,05$.²²

Cuantificación de las proteínas solubles: A continuación se determinó el contenido de proteínas solubles en los aislados proteicos AP1 y AP2 por el método de Biuret.^{23,24} Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica de bovino (por sus siglas en inglés BSA) reactivo Sigma Aldrich, usando un rango de concentraciones de 1,0 a 8,0 mg BSA/ mL.

Para esta determinación se disolvió 1 g del aislado proteico en una disolución de tartrato alcalino (1L de disolución se preparó con: 9,0 g de tartrato de sodio y potasio; 5,0g de KI; 100 mL de disolución de NaOH 6 M); se aforó con el mismo disolvente a 50 mL. Se midieron 1 mL de los estándares y de las muestras en tubos de ensayo. Se agregaron 1 mL de la disolución de tartrato alcalino a cada tubo y luego 2 mL del reactivo de Biuret (1L de disolución se preparó con: 3,0g CuSO₄·5H₂O; 9,0 g de tartrato de sodio y potasio; 5,0 de KI; 100 mL de NaOH 6 M). Las absorbancias de las muestras y los estándares con cinco repeticiones fueron leídas en un espectrofotómetro UV-VIS MARA CARY MODELO 50-BIO, a una longitud de onda de 540 nm. El contenido de proteínas solubles se expresó en mg de BSA/ mL. Los resultados fueron contrastados usando la prueba t - student pareada con un $\alpha = 0,05$.²²

Perfil electroforético de los aislados proteicos:

Para estimar los pesos moleculares de las proteínas de quinua contenidas en los aislados AP1 y AP2 se utilizó la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida – Sulfato Dodecil de Sodio (SDS-PAGE) de acuerdo a H. Schägger y G. von Jagow²⁵. Se prepararon geles separadores de poliacrilamida al 12% m/v con geles apiladores al 5% m/v. Las muestras fueron disueltas en el buffer de muestra (1,0M Tris-base, 2,4 mL de glicerol, 0,8 g SDS, 2,0 g Comassie G-250 disolución aforada a 100mL). En cada pocillo del gel separador se colocó 11 µL de las muestras, asegurándose que su concentración fuese de 30µg de proteínas/mL. Las muestras se corrieron con un voltaje constante de 100V durante 2 horas hasta que el frente del colorante azul de Comassie llegó antes del borde inferior del gel. Los geles obtenidos se fijaron y colorearon simultáneamente por 30 minutos con una disolución de etanol de concentración 46% (v/v), ácido acético 8% (v/v) y azul de Comassie 0,1% m/v usando como disolvente el agua para todas las disoluciones. Posteriormente los geles fueron decolorados con una disolución acuosa de etanol 30% v/v y ácido acético 5% v/v dejando a los geles en reposos por 12 horas. Para estimar el peso molecular de las proteínas, se utilizó un estándar con proteínas de pesos moleculares conocidos de 460, 268, 238, 171, 117, 71, 55, 41 y 31 kDa. El estándar tuvo el mismo tratamiento que las muestras.

Resultados y discusión

La tabla 1 muestra los datos obtenidos del análisis del tamaño de partícula; de igual forma en las figuras 1 y 2 se representan los resultados del análisis diferencial y acumulativo. A partir de esta información (ecuación 1) se ha determinado que su diámetro medio volumen – superficie es de 0,27 mm, puesto que se aprecia una distribución heterogénea de estas, se puede considerar que las partículas son polidespersas o poligranulares. El 48,95% de la muestra esta retenida en el tamiz número 60, que corresponde a una apertura de malla de 0,25mm, eso indicaría que el 69,5% de la harina de quinua obtenida para determinación de grasa tendría un tamaño de partícula igual o mayor a 0,25mm (ver figura1).

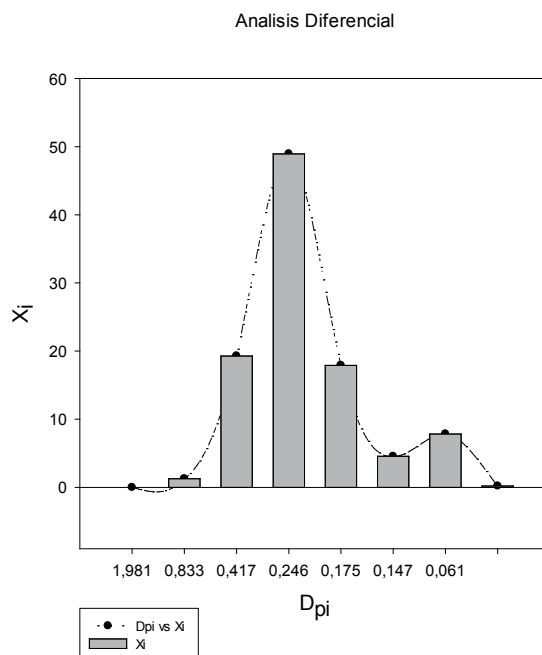
Tabla 1. Datos del análisis de tamaño de partícula por tamizado

Malla	Masa muestra (g)	D_{pi} (mm)	x_i	Σx_i	$1-x_i$	$x_i/$	
9	0,00	1,98	0,00		100,00		
20	7,04	0,83	1,28	1,28	98,72	0,01	
35	106,40	0,42	19,28	20,55	79,45	0,31	
60	270,20	0,25	48,95	69,50	30,50	1,48	
80	98,80	0,18	17,90	87,40	12,60	0,85	
100	25,20	0,15	4,57	91,96	8,04	0,28	
250	43,20	0,06	7,83	99,79	0,21	0,75	
>250	1,17		0,21	100,00			
MASA TOTAL		552,01				TOTAL	3,68

D_{pi} = Abertura de malla de cada tamiz, x_i = fracción retenida de la muestra en cada tamiz, Σx_i = fracción retenida acumulada, $1-x_i$ = fracción de muestra que pasa por cada tamiz, = Diámetro promedio de las partículas en el incremento.

Elaboración: autores

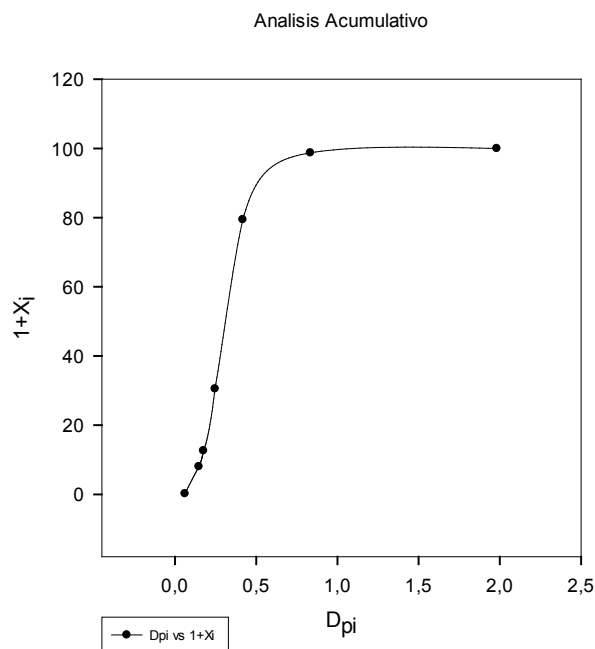
Figura 1. Análisis diferencial de la distribución de tamaños de partícula de la harina de grano de quinua.



El análisis acumulativo (ver figura 2) permite observar que el 50% de la muestra pasa por un tamiz con abertura de malla de 0,2 mm, de igual forma, el 80% de la muestra de harina de quinua pasa por un tamiz con una abertura de 0,3 mm, es así que el intervalo de variación en los tamaños de partícula no es grande.

Elaboración: autores

Figura 2. Análisis acumulativo de la distribución de tamaños de partícula de la harina de grano de quinua



La **tabla 2** muestra los resultados del análisis químico proximal de la harina de quinua que son comparables con los reportados en estudios anteriores.²⁶⁻²⁹ El análisis proximal en esta investigación constituye una evidencia del alto potencial de las semillas de quinua como un alimento completo y funcional debido a sus contenidos sobresalientes de nutrientes esenciales como proteínas, grasa y fibra¹.

Tabla 2. Datos del análisis proximal de la harina de quinua

Contenido (%)		±	S
Humedad	11,09	±	0,31
Proteína total	14,15	±	0,28
Grasa	6,73	±	0,15
Fibra bruta	3,90	±	0,22
Cenizas	2,58	±	0,02

Se reporta la media aritmética y desviación estándar para n = 5 réplicas.

Elaboración: autores

En la tabla 3 se observa los resultados del contenido de proteína total en los aislados proteicos AP1 y AP2, esto valores muestran que, independientemente de los procedimientos usados (sin y con remoción de compuestos fenólicos), el valor total de la proteínas en los aislados proteicos es igual para cada tratamiento con un $\alpha = 0,05$. Este resultado es importante debido a que indica que el tratamiento ácido previo remueve los compuestos fenólicos sin alterar la cantidad de proteínas aisladas.

Tabla 3. Contenido de proteína total en aislados proteicos sin remoción (AP1) y con remoción de compuestos fenólicos (AP2)

Repeticiones	AP1	AP2
1	70,65	71,05
2	69,31	70,04
3	70,73	70,58
4	69,03	69,59
5	70,78	69,94
\bar{x} Media () %	70,10	70,24
Desviación estándar (s)	0,77	0,51

Elaboración: autores

Como se indicó anteriormente los compuestos fenólicos pueden tener varios efectos sobre las proteínas aisladas, uno de ellos es la disminución de su digestibilidad.¹⁰ En esta investigación se encontró que el tratamiento ácido previo removió efectivamente a los compuestos fenólicos.

La tabla 4 muestra que hay una diferencia altamente significativa entre los tratamientos, tomando como base el promedio de los miligramos de ácido gálico por 100g muestra húmeda en AP1, se observa una disminución del 62% de compuestos fenólicos totales

presentes en los aislados proteicos de AP2. Sin embargo, se ha reportado que el reactivo de Folin Colcateu no es específico para los compuestos fenólicos y puede ser reducido por compuestos no fenólicos como aminos alifáticos terciarios, vitamina C, Cu (I), azúcares, aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina), entre otros,³⁰ esto indicaría que algunas proteínas globulares de la quinua interfieren en la determinación, por lo que el valor mínimo promedio de compuestos fenólicos alcanzado en AP2 es de 14,13 mg ácido gálico/100 muestra.

Tabla 4. Determinación de compuestos fenólicos totales en los aislados proteicos

Repeticiones	AP1	AP2
1	39,786	14,809
2	35,609	14,607
3	42,847	14,786
4	32,391	13,374
5	36,749	13,074
\bar{x} Media () mg ácido gálico/100g muestra húmeda	37,476	14,130
Desviación estándar (s)	3,579	0,749

Elaboración: autores

La tabla 5 muestra los resultados del contenido de proteína soluble en los aislados AP1 y AP2, los valores obtenidos no muestran diferencia significativa ($\alpha = 0,05$), lo que indicaría que el tratamiento áci-

do previo, para remover los compuestos fenólicos del aislado proteico de quinua, no altera la cantidad de proteína soluble, al igual que lo observado en la cuantificación de la proteínas total (ver tabla 3).

Tabla 5. Contenido de proteína soluble en los aislados proteicos AP1 y AP2

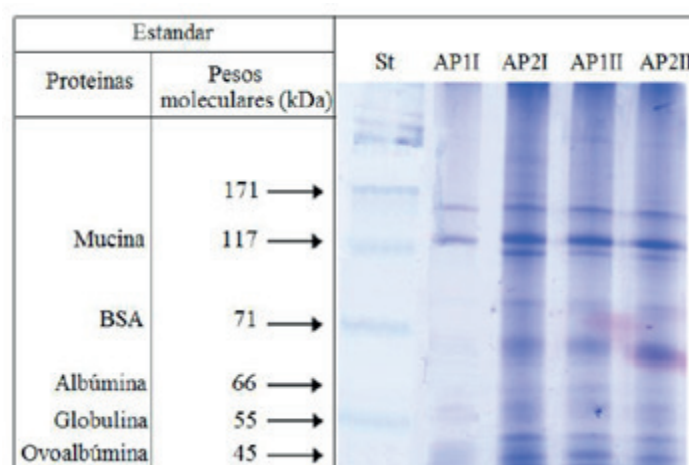
Repeticiones	AP1	AP2
1	67,552	66,181
2	66,273	72,070
3	65,843	67,372
4	67,128	62,647
5	67,982	63,324
\bar{x} Media () mg BSA/mL	66,955	66,319
Desviación estándar (s)	0,793	3,366

Elaboración: autores

La figura 3 muestra el perfil electroforético de los aislados proteicos AP1 y AP2 con dos repeticiones (I y II). Se demuestra que la remoción de compuestos fenólicos no altera el tipo de proteínas extraídas. Para ambos aislados proteicos de quinua, los pesos moleculares encontrados fueron de 171, 117, 71 y 55 kDa, estos valores se asocian a fracciones como albúminas

y globulinas,²⁶ también se pueden observar proteínas de pesos moleculares inferiores a los 45 kDa. Varios trabajos demuestran que moléculas con un peso molecular de 31-33 kDa corresponde a la chenoproteínas,¹ mientras que las prolaminas se caracterizan por tener bandas en 10, 12, 18 y 22 kDa.³¹

Figura 3. Perfil electroforético de los aislados proteicos AP1 y AP2 por duplicado



Elaboración: autores

Conclusión

La quinua, que desde tiempos antiguos fue consumida por su alto valor nutricional, ahora está siendo redescubierta por la ciencia moderna. La FAO considera a este pseudocereal como un alimento perfecto por su alta calidad proteica, que puede ser consumido como parte de una dieta balanceada junto con otros alimentos y mejorar la nutrición. La proteína está constituida principalmente por albúminas, globulinas y prolaminas, únicamente la presencia de compuestos fenólicos influye en su digestibilidad. En las condiciones de estudio, un tratamiento ácido, previo a la extracción y precipitación de las proteínas de

quinua, puede remover hasta un 62% de compuestos fenólicos totales del aislado. Este procedimiento, sencillo y de bajo costo, no altera el contenido de proteínas (totales y solubles) y es una alternativa tecnológica viable a nivel industrial.

Conflictos de interés

Ninguno declarado por los autores.

Financiamiento

Universidad Central del Ecuador a través de los fondos para investigación semilla.

Referencias

1. Elsohaimy S, Refaay T, Zaytoun M. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Science*, 2015: 297-305.
2. Repo-Carrasco R, Espinoza C, . Jacobsen S. Nutritional Value Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*), *Food Reviews International*, 2003; vol. 19, n° 1 y 2, 179-189.
3. Ando H, Chen Y.-C, Tang H, Shimizu M,. Watanabe K,. Mitsunaga T. Food Components in Fractions of Quinoa Seed, *Food Science and Technology Research*. 2002:80-84.
4. Przygoda K, Wejnerowska G. Extraction of tocopherol-enriched oils from Quinoa seeds by supercritical fluid extraction, *Industrial Crops and Products*. 2015: 41-47.
5. Repo-Carrasco-Valencia. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa. *Food Chemistry*. 2009:128-133.
6. Lutz M, Martínez A, Martínez E. A. Daidzein and Genistein contents in seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from local ecotypes grown in arid Chile. *Industrial Crops and Products* 2013: 117-121.
7. Graf B. L, Poulev A, Kuhn P, Grace M. H, Lila M. A, Raskin I. Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds. *Food Chemistry* 2014: 178-185.
8. Villacrés E, Cuadrado L, Falconí F. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. 2013.
9. Kuljanabhadgavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, Wink M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry*. 2008: 1919-1926.
10. Bejosano B. P, Corke H. Protein Quality Evaluation of Amaranthus Wholemeal Flours and Protein Concentrates. *J Sci Food Agric*, pp. 100-106, 1998.
11. González-Pérez S, Merck K. B, Vereijken J. M, Van Koningsveld G. A, Gruppen H, Voragen A. G. Isolation and Characterization of Undenatured Chlorogenic Acid Free Sunflower (*Helianthus annuus*) Proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2000: 1713-1719.
12. Marcone M. F, Kakuda Y. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. *Nahrung*. 1999: 368-373.

13. Rubino M. I, Amfield S. D, Nadon C. A, Bernatsky A. Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. *Food Research International*.1990: 653-659.
14. Xu L, Diosady L. L. Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Research International*. 2002:23-30.
15. L'Hocine L, Boye J. I, Arcand Y. Composition and Functional Properties of Soy Protein Isolates Prepared Using Alternative Defatting and Extraction Procedures. *Food Chemistry and Toxicology*. 2006: C137-C145.
16. Elsohaimy S. A, Refaay T. M, Zaytoun M. A. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Science*. 2015: 1-9.
17. Kirk R, Sawyer R, E. H. *Composición y Análisis de los Alimentos*, México: Compañía Editorial Continental; 1999.
18. McCabe W, S. J, Harriot P. *Operaciones unitarias en ingeniería química*. Séptima ed., Ciudad de México: Mc Graw – Hill; 2007.
19. Latimer G. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Décima novena ed. Maryland: AOAC International; 2012
20. Vidal Novoa A, Motidome M, Mancini-Filho J, Fallarero Linares A, Midori Tanae M, Brandao Torres L. M, Lapa A. J. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos el alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelin) Howe. *Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2001: 373-382.
21. Repo de Carrasco R, Encina Zalada C. R. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y Kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Revista Sociedad Química Perú*. 2008: 85-99.
22. Miller J, Miller J. *Estadística y Quimiometría para la Química Analítica*. Madrid: Prentice Hall; 2002.
23. Gornall A, Bardawill C. J, David M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 1949: 751-766.
24. Turgut H. Drawbacks in the use of the Biuret method for determination the same protein in differently treated fish samples. *Food Chemistry*. 1979: 161-165.
25. Schägger H, Von Jagow G.. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 1987: 368-379.
26. Koziol M. J. Chemical Composition and Nutritional Evaluation of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), *Journal of Food Composition and Analysis*. 1992. pp. 35-68.
27. Ruales J, Nair B. M. Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. *Food Chemistry*. 1993: 131-136
28. Bhargava A, Shukla S, Ohri D. *Chenopodium quinoa—An Indian perspective*. *Industrial Crops and Products*. 2005: 73-87.
29. Peralta E. Variedad mejorada de quinua de bajo contenido de saponinas, INIAP, 2010
30. Castel M. Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas del amaranto. Universidad Nacional del Litoral, Argentina; 2010.
31. Segura-Nieto M., Barba de la Rosa A. P, Paredes-López O. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed *proteins*. *J. Agric. Food Chem* 1992; 40 (9): 1553–1558.
32. Fernández-Pachón M. S, Villaño D, Troncoso A. M, García-Parrilla M. Determination of the phenolic composition of sherry and table whites wines by liquid chromatography and their relation whit antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*. 2006;563: 101-108.