

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS:

**Contenido de prolaminas en cuatro accesiones de
Chenopodium quinoa Willd “quinua”**

Para optar el título profesional de:

BIÓLOGO, ESPECIALIDAD: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Marco Antonio BORDA LIZARBE

ASESORA:

Dra. Roberta Brita ANAYA GONZÁLEZ

AYACUCHO - PERÚ

2024

A mi familia, en especial a mi madre Marisol, mi abuela Dorotea, a mi tía Yolanda por motivarme cada día a ser mejor que ayer.

AGRADECIMIENTO

A la Real y Pontificia Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por darme la oportunidad de formarme íntegramente como profesional y civil.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, que me compartieron sus conocimientos científicos y valores creando en mi un espíritu de innovación e investigación.

Al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga que me permitió el uso de los equipos, sus instalaciones y apoyo del proyecto FOCAM para poder concretar esta investigación.

A la Dra. Roberta Brita Anaya González, quien cumplió como docente asesora de la presente tesis, por su guía, dedicación y apoyo en la ejecución de este trabajo de tesis.

Al Mg. Reynán Cóndor Alarcón, por su rol como co-asesor y sobre todo por su paciencia, disposición y asesorías en el área de la estadística en la investigación.

Al Centro de Culturas Indígenas del Perú (CHIRAPAQ) por el seguimiento y el apoyo económico para la finalización de la presente tesis.

A mi querido amigo Miguel Elohi Arteaga Valdivia, quién con su entusiasmo, asistencia y apoyo se logró la ejecución de este trabajo en su tiempo planificado.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. La quinua	4
2.2.1. Taxonomía de la quinua	5
2.2.2. Características botánicas y morfológicas	5
2.3. Proteínas de la quinua	8
2.3.1. Aminoácidos	9
2.3.2. Prolamina de quinua	9
2.3.3. Prolaminas en la dieta de pacientes celíacos	11
2.4. Extracción de proteínas	12
2.4.1. Método de extracción modificado de Osborne y Mendel	12
2.4.2. Electroforesis	13
2.5. Cuantificación de proteínas	15
2.6. Método de tinción de Bradford	15
III. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Ubicación	17
3.1.1. Ubicación política	17
3.1.2. Ubicación geográfica	17
3.2. Población	17
3.3. Muestra	17
3.4. Etapa I: Preparación de la muestra	17
3.5. Etapa II: Extracción de proteínas - Método modificado de Osborne	18
3.5.1. Extracción de albúminas	18
3.5.2. Extracción de Globulinas 7s	19
3.5.3. Extracción de Globulinas 11s	19

3.5.4. Extracción de Prolaminas	19
3.6. Etapa III: Concentración de proteínas	19
3.7. Etapa IV: Cuantificación de proteínas por método de Bradford	20
3.8. Etapa V: Preparación de muestras proteicas y armado de matriz electroforética	21
3.8.1. Preparación de proteínas	21
3.8.2. Ensamblaje de matriz para electroforesis	21
3.9. Etapa VI: Preparación y corrida de geles SDS-PAGE	21
3.10. Etapa VII: Coloración y revelado de proteínas	23
3.11. Análisis estadístico	23
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Perfil de aminoácidos de quinua (mg/100 mg proteína) y de otros granos comparados con las referencias nutricionales de FAO.	9
Tabla 2. Dilución seriada de estándares de BSA para la curva de calibración por el método de Bradford.	20
Tabla 3. Concentraciones de reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida.	22
Tabla 4. Estimación de pesos moleculares de prolaminas en 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" provenientes de los distritos de Vilcas Huamán (VI-), Acocro (AC-) y Chiara (CH-), Ayacucho 2024.	31
Tabla 5. Cuantificación de prolaminas de 4 accesiones con 3 réplicas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" mediante la técnica de Bradford provenientes del distrito de Vilcas Huamán (VI-), Ayacucho 2024.	33
Tabla 6. Cuantificación de prolaminas de 4 accesiones con 3 réplicas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" mediante la técnica de Bradford provenientes del distrito de Acocro (AC-), Ayacucho 2024.	34
Tabla 7. Cuantificación de prolaminas de 4 accesiones con 3 réplicas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" mediante la técnica de Bradford provenientes del distrito de Chiara (CH-), Ayacucho 2024.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Adaptación simplificada de la patogénesis de la enfermedad de pacientes celiacos.	12
Figura 2. Reactivos para el fraccionamiento de 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua". Ayacucho 2024.	19
Figura 3. (a) Cámara de electroforesis conectada a la fuente de poder; (b) matriz ensamblada con placas de vidrio.	21
Figura 4. Señalización de bandas en electroforesis SDS-PAGE de prolaminas de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) al 15 % Carril: M, MP (WSHT MKP007), carril 1, 2, 3 y 4 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Chiara; 5, 6, 7 y 8 accesión blanca, negra, roja y amarilla de Acocro; 9, 10, 11 y 12 accesión blanca, negra, amarilla y roja de Vilcas Huamán; réplica N° 1.	25
Figura 5. Señalización de bandas en electroforesis SDS-PAGE de prolaminas de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) al 15 % Carril: M, MP (WSHT MKP007), carril 1, 2, 3 y 4 accesión blanca, negra, roja y amarilla de Chiara; 5, 6, 7 y 8 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Acocro; 9, 10, 11 y 12 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Vilcas Huamán; réplica N° 2.	26
Figura 6. Señalización de bandas en electroforesis SDS-PAGE de prolaminas de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) al 15 % Carril: M, MP (WSHT MKP007), carril 1, 2, 3 y 4 accesión blanca, negra, roja y amarilla de Chiara; 5, 6, 7 y 8 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Acocro; 9, 10, 11 y 12 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Vilcas Huamán; réplica N° 3.	27
Figura 7. Linealización de los estándares de peso moleculares (kDa) con su distancia de recorrido (Dc), réplica N° 1.	28
Figura 8. Linealización de los estándares de peso moleculares (kDa) con su distancia de recorrido (Dc), réplica N° 2.	29
Figura 9. Linealización de los estándares de peso moleculares (kDa) con su distancia de recorrido (Dc), réplica N° 3.	30
Figura 10. Linealización de la absorbancia del estándar BSA frente a la concentración (µg/µL).	32
Figura 11. Comparación de prolaminas en 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" del distrito de Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.	36

Figura 12. Comparación de prolaminas en 4 accesiones de *Chenopodium* 37
quinoa Willd "quinua" del distrito de Acocro, Ayacucho 2024.

Figura 13. Comparación de prolaminas en 4 accesiones de *Chenopodium* 38
quinoa Willd "quinua" del distrito de Chiara, Ayacucho 2024.

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Clasificación taxonómica de 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd, Ayacucho 2024.	54
Anexo 2. Preparación de soluciones para la fragmentación de proteínas (método modificado de Osborne).	55
Anexo 3. Preparación de soluciones de trabajo para preparar gel SDS-PAGE (método de Laemmli).	56
Anexo 4. Preparaciones de geles SDS-PAGE (método de Laemmli).	57
Anexo 5. Preparación de soluciones para corrida electroforética de gel SDS-PAGE (método de Laemmli).	58
Anexo 6. Preparación de soluciones para la coloración y decoloración de gel SDS-PAGE (método modificado de Laemmli).	59
Anexo 7. Flujograma de proceso de extracción de fracciones proteicas según metodología modificada de Osborne.	60
Anexo 8. Flujograma para la preparación de geles para cámara pequeña de 1,5 mm.	61
Anexo 9. Vista panorámica del centro poblado de San Miguel de Motoy y Motoy alto – distrito de Chiara, Ayacucho 2024.	62
Anexo 10. Recolección de 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” en el distrito de Chiara, Ayacucho 2024.	63
Anexo 11. Vista panorámica de los centros de agricultura de Seccelambras, Chontaca y Acocro respectivamente del distrito de Acocro, Ayacucho 2024.	65
Anexo 12. Recolección de 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” en el distrito de Acocro, Ayacucho 2024.	66
Anexo 13. Vista panorámica del distrito de Vilcas Huamán – Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.	68
Anexo 14. Recolección de 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” en el distrito de Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.	69
Anexo 15. Muestras libres de impurezas de 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” provenientes de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, Ayacucho 2024	70
Anexo 16. Proceso de deslipidización con N-hexano de 4 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” provenientes de los distritos de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.	70

- Anexo 17.** Proceso de extracción de proteínas de 4 accesiones de 72 *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” provenientes de los distritos de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.
- Anexo 18.** Proceso de extracción de prolaminas de 4 accesiones de 73 *Chenopodium quinoa* Willd provenientes de los distritos de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.
- Anexo 19.** Preparación de estándares de BSA al 10 % para la curva de 75 calibración mediante la técnica de Bradford.
- Anexo 20.** Tesista resuspendiendo concentrado de proteínas de prolamina 76 en 1000 µL de H2O bidestilada, desionizada y autoclavada de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.
- Anexo 21.** Corrida de electroforesis SDS-PAGE de las 4 accesiones de 77 *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” provenientes de los distritos de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán.
- Anexo 22.** Matriz de consistencia. 79

RESUMEN

La quinua es un pseudocereal conocida como un alimento completo y milenario por nuestros antepasados andinos. Con el objetivo de cuantificar y comparar, analizar las prolaminas en mg/kg, determinar el perfil electroforético y la correlación de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd (blanco, negro amarillo y rojo) provenientes de Vilcas Huamán, Acocro y Chiara, se usó como principal técnica el fraccionamiento de proteínas modificado por Osborne y electroforesis de Laemmli. Se hicieron 3 réplicas por accesión y 3 repeticiones por cada réplica. Los resultados mostraron una variabilidad en el contenido de prolaminas de quinua, el mayor valor de Vilcas Huamán con 1,629 mg/kg (amarilla) y el menor con 0,059 mg/kg (negra); la muestra de Acocro con un máximo valor de 2,609 mg/kg (amarilla) y menor con 1,221 mg/kg (roja), de Chiara el mayor valor con 0,890 mg/kg (amarilla) y el menor con 0,378 mg/kg (blanca), destacando la accesión amarilla con mayor contenido de prolaminas en las 3 zonas de muestreo. Los perfiles electroforéticos revelaron bandas entre los intervalos de 11 y 17 kDa, y en los triplicados se obtuvieron bandas de 14 y 15 kDa siendo repetitivas entre las accesiones negra, blanca, roja y amarilla y entre los 3 lugares.

Palabras clave: *Chenopodium quinoa* Willd, prolaminas, electroforesis, proteínas, quinua

I. INTRODUCCIÓN

La quinua, un pseudocereal, conocida desde tiempos milenarios por sus propiedades nutricionales tiene un alto valor nutritivo por el contenido de aminoácidos esenciales, es preventivo ante el cáncer, antimicrobiano, antioxidante, antidiabético, anti obesidad y con beneficio para los cardiacos (Angeli, et al., 2020), a comparación de los granos convencionales, se considera como un promisorio alimento funcional, además de tener un perfecto balance entre las grasas, aceites y proteínas (Amit et al., 2021). El Perú, mediante el MINSA (Ministerio de Salud), celebraron en el año 2013 como el año internacional de la quinua, nombrado por el Organismo Internacional de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2013). Reconociendo que en la actualidad, la población está en la etapa de crecimiento exponencial con una simultánea reducción de recursos afectado por la salinización y desertificación, resultado del cambio climático y otras actividades antropogénicas (FAO, 2013).

Las proteínas de la quinua tienen un alto valor de absorción biológica (73 %) comparando con la carne (74 %) y la avena (49 %); las proteínas principales en la quinua son las albúminas (53 %), globulinas 7S y 11S (37 %), prolaminas y glutelinas están en cantidades indetectables (Pathan & Siddiqui, 2022). Las primeras fracciones proteicas de la quinua son conocidas al detalle, no obstante la presencia de prolaminas en semillas de quinua aún es escasa, por tanto la cuantificación de las prolaminas presentes en la quinua es de vital importancia en la comprensión de su rol tanto en la calidad tecnológica como en la dimensión nutricional del grano (Song et al., 2021). Además, el impacto en personas intolerantes al gluten. Estos estudios más profundos en torno a las proteínas de origen vegetal no sólo enriquecen el conocimiento en nuestra región, sino que también desempeña un papel esencial en la mitigación de la desnutrición, una cuestión crucial en el contexto de la salud pública y la seguridad alimentaria.

Este trabajo se centra en la cuantificación y caracterización de prolaminas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” provenientes de los distritos de Acocro, Chiara y Vilcas Huamán que consiste en extraer, cuantificar y evaluar las prolaminas por el método modificado de fraccionamiento de proteínas según Osborne (Romero-Rodríguez et al., 2014); en tal sentido se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar la variabilidad del contenido de prolaminas en cuatro accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.

Objetivos específicos

1. Cuantificar el contenido de prolaminas en cuatro accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.
2. Determinar el perfil electroforético de los aislados de prolaminas en cuatro accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.
3. Comparar el contenido de prolaminas entre las cuatro accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.
4. Analizar la correlación entre los perfiles de prolaminas de las diferentes accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La semilla de quinua contiene globulinas del tipo 11S, que abarca alrededor del 37 % y la albúmina 2S que representa el 35 % de las proteínas totales de la semilla madura. Adicionalmente, la semilla de *Chenopodium quinoa* contiene una poca concentración de prolaminas, del 0,5 - 7 % de proteínas totales, siendo digerible y recomendado para pacientes con enfermedades celíacas (Dakhili et al., 2019). Tavano et al. (2022), obtuvo el fraccionamiento proteico aplicando un proceso completo: 26,96 % de albúminas, 41,3 % de globulinas, 1,7 % de prolaminas y 23,16 % de glutelinas. Las fracciones proteicas al ser digeridas con pepsina y después con pancreatina, los grados hidrolíticos alcanzaron una variación entre globulinas y glutelinas sin ser sometidas al calor, siendo 2,62 % y 38,97 % respectivamente y con caseína aumentaron a 34,7 % de globulinas; sin embargo, al ser sometidas en calor, la solubilidad de la globulina incrementó a 34,7 %, resultando igual frente al uso de caseína. Los resultados son promisorios a la alta susceptibilidad para hidrolizar las proteínas con enzimas digestivas, y refuerzan la observación con ensayos separados usando pepsina, tripsina y quimotripsina. Para la fragmentación de proteínas presentes en la quinua, usaron el método Osborne, obteniéndose un alto rendimiento con doble extracción, seguido de agua con cloruro de sodio a 0,4 mol/L. Se representaron las albúminas (41 - 50 %), globulinas (7 - 11 %), prolaminas (4 - 6 %) y glutelinas (14 - 16 %) de cuatro cultivares de quinua. Luego, las proteínas obtenidas fueron separadas por SEC-HPLC (cromatografía por exclusión de tamaño) con SDS contenido en un medio de emulsión; seguido de la técnica de separación por electroforesis identificando los tipos de extracción por Osborne. El uso de SEC-HPLC permite conocer los cambios efectuados durante el procesamiento de alimentos al extraer las proteínas de la quinua (Van de Vondel et al., 2020).

En la revisión de Dakhili, describe las propiedades nutricionales y funcionales en base a la alta cantidad de aminoácidos y proteínas, especialmente rica en lisina. Una semilla madura, se conforma de globulinas 7S y 11S conocida como chenopodina en 37 % y 35 % de albúmina de la proteína total. En casos clínicos de pacientes con enfermedades celíacas, este pseudocereal con cantidades bajas de prolaminas en un 0,5 % a 7 % del total de proteínas, lo hace excelente para el consumo. Acorde a lo investigado, sobre las bondades nutri-funcionales, se considera como un buen candidato para la soberanía alimentaria de futuras generaciones (Dakhili et al., 2019).

2.2. La quinua

La quinua tiene una diversidad de nombres en quechua, aymara, mapuche, araucana, chibcha entre ellos está los más comunes: kinua, quiuna vocali, quinua dulce, jara, candona, quiñoa, jiura, jopa, parca y entre otros (Fernando et al., 2016); este pseudocereal, grano milenario, son cultivados en los países altoandinos como Perú y Bolivia, que data de más de 5000 a 3000 A.C. (Bedoya-Perales et al., 2018). La quinua es considerada como un súper alimento por sus altas cantidades de aminoácidos esenciales y su baja cantidad de gluten, haciéndola más digerible para todo tipo de consumidor (FAO, 2013).

A través de la historia, fue considerada como un alimento sagrado y que los Incas eran los únicos en tener acceso a ese alimento, con la llegada de los españoles, estos conceptos fueron cambiados como un alimento “no cristiano”, siendo vetado de la alimentación de los peruanos antiguos (Fernando et al., 2016). En las décadas recientes, la producción de quinua ha empezado a crecer, siendo el 2013 como año internacional de la quinua, ganando atención mundial, no solo por las propiedades funcionales que tiene, sino por la versatilidad de adaptación a condiciones adversas (FAO, 2013).

La quinua se cultiva autóctonamente en zonas de Sudamérica, en diversos suelos con un rango de pH que varía entre 3,5 a 8,5; muestra tolerancia a heladas, sequías, salinidad y tiene la habilidad de crecer en suelos marginales, estas características le han permitido aumentar los cultivos alrededor del mundo. sin embargo, las diferentes modificaciones genéticas, fisiológicas y morfológicas conducen a la alteración de la planta (Hinojosa et al., 2018). Desde la publicación del genoma de la quinua, se finiquitaron estudios de transcriptomas relacionados a la salinidad y sequía, además de información sobre tolerancia, heladas, radiación UV-B (Hinojosa et al., 2018; Jarvis et al., 2017) .

Por más de su valor agronómico e interés comercial, los cultivos de quinua aún no son utilizados hasta su nivel máximo, con pocos programas de cruzamientos (Jarvis et al., 2017), se requieren esfuerzos de mejoramiento para acelerar la expansión de producción de quinua a nivel mundial, el conocimiento del genoma de la quinua permitirá la introducción y expansión de este pseudocereal, sin dejar de lado los cultivos como el trigo, cebada, avena, habas y arvejas (Gómez & Aguilar, 2016). Adicionalmente, sus granos son altamente ricos en cantidad y calidad de proteínas y compuestos bioactivos; de esta forma, la quinua, no solo por su historia milenaria, es un alimento nutracéutico con propiedades múltiples, así como la prevención de enfermedades cancerígenas debido a la calidad de sus aminoácidos (Fuentes & Paredes-Gonzalez, 2014).

En el Perú se encuentra 36 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd, como: INIA 431 – Altiplano, INIA 427 - Amarilla Sacaca, INIA 420 - Negra Collana, INIA 415 – Pasankalla, Illpa INIA, Salcedo INIA, Quillahuaman INIA, Ayacuchana INIA, Amarilla Marangani, Blanca de Juli, Blanca de Junín, Cheweca, Huacariz, Hualhuas, Huancayo, Kankolla, Mantaro, Rosada de Junín, Rosada Taraco y Rosada de Yanamango (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, 2015).

2.2.1. Taxonomía de la quinua

De acuerdo al Sistema de Clasificación Cronquist. A. 1988, la clasificación actual es la siguiente:

Reino: : Plantae
División: : Magnoliophyta
Clase: : Magnoliopsida
Sub clase: : Caryophyllidae
Orden: : Caryophyllales
Familia: : Chenopodiaceae
Género: : Chenopodium
Especie: : *Chenopodium quinoa* Willdenow

Nombre vulgar : quinua blanca, quinua amarilla, quinua negra y/o quinua roja.

2.2.2. Características botánicas y morfológicas

Las especies domesticadas de quinua son plantas herbáceas, una dicotiledónea anual, con tallo erecto de entre 1 a 2 m, leñoso pigmentado de morado, rojo y verde debido a las betacianinas, el tallo central con ramificaciones dependiendo de la variedad (Council et al., 1989) siendo más específicos tetraploides, halófito y predominantemente se autopoliniza (autógama), pero la tasa de hibridación

natural es de 10 a 17 % y esto dependiendo si existe coincidencia en las florescencias de otras quinuas (Zurita-Silva et al., 2014); botánicamente no pertenece a los cereales verdaderos como lo es el trigo, la cebada, maíz y arroz, pero debido a su contenido bajo en almidón se le conoce como un pseudocereal. Además, se conoce que la quinua se puede clasificar en accesiones dulces y amargas, esto en relación al contenido de saponinas (García-Parra et al., 2018). La importancia de la quinua, reside en su fuente como alimento debido a su balance de aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales la alta plasticidad a diferentes condiciones agroecológicas (Nolasco et al., 2013). Por consiguiente, las diversas accesiones presentes en el territorio peruano difieren ampliamente permitiendo la existencia de genotipos nuevos (Donaire, 2018a).

a) Raíz

La raíz de quinua es profunda, fibrosa, consta de una raíz principal (pivotante) de la cual salen ramificaciones (secundarias y laterales) lo que les permite estabilidad y resistencia a épocas de sequía. La longitud de las raíces es variable, de 6 a 1,80 cm. Su desarrollo, crecimiento, longitud, distribución de ramificaciones laterales e incluso la pigmentación varía según el genotipo, tipo de suelo, nutrición y humedad entre otros factores, el tamaño de la raíz dependerá del tamaño de la planta (Mujica et al., 2014).

b) Tallo

Cuenta con un tallo leñoso que dependerá de las condiciones bióticas, pueden llegar a medir alrededor de 0,3 - 3 m, el color básico en la época de floración y las condiciones climáticas, puede ser verde, naranja, rosado, rojo, púrpura y en algunos casos amarillo como el amaranto, pero dependerá del genotipo y en las fases en las que se encuentra. Las combinaciones como el color básico del tallo, color de las estrías y el color de axilas puede ser empleado como criterios taxonómicos. A la madurez el color del tallo, en general, se torna de un color crema o rosado con diferentes intensidades (Mabry et al., 1963 citado por Hussain et al., 2021).

De acuerdo con el hábito de ramificación pueden verse modificadas ante la presencia de insectos con impactos negativos agrícolas, daños mecánicos o por alguna práctica cultural. Este tipo de tallo oscila entre 1 a 8 cm de grosor, variando según el genotipo; se encuentra predominantemente en accesiones de los ecotipos del altiplano y de los salares. Hábito ramificado (quinua del mar) y hábito sin ramificar (meseta) o intermedias ramificadas depende del genotipo y está

altamente influenciado por la densidad de siembra, disponibilidad de nutrientes y las áreas de crecimiento (suelo) y pisos altitudinales (altura) (Donaire, 2018b).

c) Hojas

Las hojas muestran polimorfismos; mientras que las hojas superiores son lanceoladas, las inferiores son romboidales, están formadas por el peciolo y la lámina. El peciolo de las hojas es largo, delgado y acanalado, su longitud depende de su origen; la pigmentación puede ser verde, rosado, rojo y púrpura. La lámina de la hoja es polimorfa y tiene tres venas principales que se originan del peciolo, son más grandes en el follaje y más pequeñas en la inflorescencia, la morfometría varía según el ecotipo (Christensen et al., 2007).

Las láminas de la planta pueden ser triangulares o romboidales y de consistencia succulenta, en ambas partes pueden presentar oxalato de calcio que cumplen con la función de reducir la transpiración excesiva manteniendo la homeostasis (Christensen et al., 2007a), las hojas y las partes tiernas de la planta están generalmente cubiertas con una pubescencia vesicular–granular blanca, rosada o púrpura. El color de la lámina predominantemente es verde; en algunas accesiones puede observarse hojas de color verde-púrpura. A la madurez las láminas se tornan amarillas, naranjas, rosadas, rojas o púrpuras (Allende, 2017).

d) Inflorescencia y flores

Es una panoja que pueden ser laxas o compactas con una longitud variable de 15 – 70 cm con ejes secundarios y terciarios. Generalmente se encuentra en el ápice de la planta y en el ápice de las ramas. Tiene un eje principal, ejes secundarios y eje terciarios. Considerando la forma y posición de los grupos de flores (glomérulos) se clasifican en amarantiformes (inflorescencias escasas), glomeruladas (inflorescencias compactas) e intermedias (transición de las amarantiformes y glomeruladas) (Mujica et al., 2014).

En el grupo amarantiforme varias ramas secundarias y terciarias están directamente insertados en el eje con penachos sueltos y los glomérulos tienen una forma casi rectangular, muy semejantes a dedos con pedicelos cerrados. En el tipo glomerulada los glomérulos pueden presentar flores perfectas y pistiladas. El tamaño de crecimiento dependerá de la nutrición agrícola, generalmente el número de glomérulos por panícula varía entre 75 a 120, una panícula robusta puede producir hasta 500 g aproximadamente (Hussain et al., 2021; Risi & Galwey, 1989).

Una característica de la quinua es que presenta flores femeninas autógama (17 %

aproximadamente) y monógamas (hermafroditas). Las flores hermafroditas están ubicadas en el extremo distal con cinco anteras (ápice del glomérulo) y son relativamente más grandes que las que tienen pistilos, presentan cinco estambres anti-sépalos y sépalos imbricados, un ovario superior con dos a tres ramas estigmáticas y tiene 5 lóbulos del perianto. Puede ocurrir una polinización cruzada, pero en un rango de 10 % a 15 %. Las flores perfectas presentan un perigonio sepaloide, las semillas son contenidas en la panícula que la planta crea al madurar (Nasim et al., 2021).

e) Fruto

Es un aquenio indehiscente de forma lenticular, elipsoidal, cónico o esferoidal, cubierto por el perigonio sepaloide o las envolturas florales que rodean el fruto y se desprenden, presentan una única semilla, presenta diversidad de colores por los pigmentos recubiertos que va desde extremadamente amarillos hasta magenta. La presencia de saponinas en las semillas de quinua es debido al pericarpio, rodea al aquenio, que está adherido a la semilla, dándole la característica de un sabor amargo, la episperma se ubica debajo del epicarpio. Estas tienen forma esférica de un diámetro que oscila entre 1,0 y 2,6 mm, tienen 3 partes a conocer epispermo, embrión y perispermo. El perispermo es una fuente de reserva de almidón, color blanquecino y representa la mayor parte de la semilla (Allende, 2017; Koziol, 1992, Nasim et al., 2021).

2.3. Proteínas de la quinua

La quinua es una fuente rica en proteínas que varía entre 11 % y 22 % dependiendo de la variedad, contiene un balance adecuado de aminoácidos esenciales, convirtiéndola en un alimento de gran interés nutricional, funcional y terapéutico. La proteína de la quinua es considerada de alta calidad debido a su contenido de aminoácidos esenciales, especialmente lisina, metionina y cisteína, los cuales suelen ser limitantes en otros granos (Christensen et al., 2007). La quinua también es una fuente importante de proteínas de almacenamiento, incluyendo las globulinas, albúminas y prolaminas; los principales componentes proteicos de la quinua son: globulinas y albúminas con 37 % y 35 %, respectivamente, con poca presencia de prolaminas (Filho et al., 2017a).

Las proteínas de la quinua tienen una estructura secundaria compleja, lo que les confiere propiedades funcionales únicas. Por ejemplo, las globulinas de la quinua tienen la capacidad de formar geles y emulsiones, mientras que las albúminas son solubles en agua y se utilizan a menudo en la industria alimentaria como agentes

emulsionantes. Las prolaminas, por otro lado, son proteínas que se encuentran principalmente en las semillas y son resistentes a la digestión (Hao et al., 2022).

2.3.1. Aminoácidos

La composición de aminoácidos de la quinua también es de interés, ya que los aminoácidos son esenciales para la síntesis de proteínas y otros compuestos importantes para el cuerpo humano. El 37 % de las proteínas que posee la quinua está formado por aminoácidos esenciales y son 10 que son estrictamente necesarios (tabla 1), por lo que necesitan ser ingeridos a través de la dieta; la carencia de estos aminoácidos limita el desarrollo del organismo, ya que no es posible reconstituir las células de los tejidos que mueren o crear nuevos tejidos, en el caso del crecimiento (Repo-Carrasco et al., 2003; Vega-Gálvez et al., 2010a).

Tabla 1. Perfil de aminoácidos de quinua (mg/100 mg proteína) y de otros granos comparados con las referencias nutricionales de FAO.

Aminoácidos	FAO	Quinoa	Maíz	Arroz	Avena
Isoleucina	3,0	4,9	4,0	4,1	4,2
Leucina	6,1	6,6	12,5	8,2	6,8
Lisina	4,8	6,0	2,9	3,8	2,6
Metionina	2,3	5,3	4,0	3,6	3,7
Fenilalanina	4,1	6,9	8,6	10,5	8,2
Trionina	2,5	3,7	3,8	3,8	2,8
Triptófano	0,7	0,9	0,7	1,1	1,2
Valina	4,0	4,5	5,0	6,1	4,4

Nota: Tabla de perfil de aminoácidos de quinua, maíz, arroz y avena adaptado de Angeli, Silva, et al., 2020 y de FAO, 2011.

La apreciación de los valores del contenido de aminoácidos en la proteína de los granos de quinua cubren los requerimientos básicos: histidina, isoleucina, lisina, metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano, recomendados para la dieta de niños en etapa pre-escolar, escolar y adultos, de acuerdo a la comparación con los estándares FAO/OMS/ONU (Abugoch, 2009; FAO, 2011). Las concentraciones de aminoácidos y de proteínas pueden variar significativamente por el tipo de suelo. Por otro lado, si la planta es tratada con dosis de nitrógeno correctos, entonces se aumentará el contenido de proteínas en las semillas. No obstante, la importancia de los aminoácidos de esta planta alto-andina se fundamenta en su calidad (Vega-Gálvez et al., 2010a).

2.3.2. Prolamina de quinua

Las prolaminas son un tipo de proteína que se encuentra en granos como el trigo, la cebada y el centeno, por otro lado, en pseudocereales como la quinua y el

amaranto; son proteínas de almacenamiento de semillas que juegan un papel importante en la calidad nutricional y tecnológica de los alimentos. En la quinua, las prolaminas son una de las principales fracciones proteicas de almacenamiento y representan aproximadamente el 6 % de las proteínas totales en la semilla, están compuestas por dos tipos principales de proteínas, la quinoaína y la amarantoína (Filho et al., 2017a).

Las prolaminas, están clasificadas en cuatro grupos: α - (más abundantes), β -, γ -, δ -/ ω - que difieren en su estructura y composición de aminoácidos, las fracciones de proteínas en quinua fueron caracterizadas décadas anteriores, las albúminas son solubles en agua porque tiene largas cadenas de aminoácidos polares, mientras que las prolaminas son una de las fracciones proteicas con menor solubilidad en agua por lo que deben ser suspendidos en etanol al 95 % y en algunos casos con 0,6 % de β -2-mercaptoetanol, las prolaminas se encuentran en concentraciones bajas (≤ 7 %), sin embargo, dependerá de la accesión (Filho et al., 2017b). Además de representar un problema frente a pacientes con enfermedades celíacas; ya que tanto como las globulinas y proteínas, son resistentes a las proteasas, esto representa numerosos péptidos de gluten inmunogénicos (Zevallos et al., 2012) y factores agronómicos.

Se ha estudiado la relación con su implicación en la calidad tecnológica del grano, como la viscosidad del almidón y la formación de gel y en relación con la calidad nutricional, ya que contienen aminoácidos esenciales y tienen una alta digestibilidad. A pesar de estos beneficios, existen cierta población de personas que pueden ser sensibles a las prolaminas y experimentar síntomas similares a los de la enfermedad celíaca, que es una reacción al gluten. La sensibilidad a las prolaminas puede ser causada por una variedad de factores, incluyendo la genética y la microbiota intestinal; en términos generales, los complejos basados en prolaminas tienden a formar estructuras núcleo-capa, que forman en el núcleo una nanósfera con un interior hidrofóbico e hidrofílico, sobre la capa externa actúan como una cubierta a la estructura (Paliwal & Palakurthi, 2014).

Además, de su importancia nutricional, las prolaminas de la quinua también tienen propiedades funcionales que las hacen útiles en la industria alimentaria. Por ejemplo, la quinoaína se ha utilizado en la producción de hidrolizados proteicos y en la elaboración de alimentos sin gluten. La amarantoína, por otro lado, se ha utilizado en la producción de películas comestibles y recubrimientos para alimentos. La importancia de las prolaminas en la quinua también se ha

relacionado con su capacidad para reducir los efectos negativos de los antinutrientes presentes en la quinua. Estos antinutrientes, como la saponina, pueden reducir la absorción de nutrientes y afectar la calidad nutricional de la quinua. Sin embargo, se ha encontrado que las prolaminas pueden unirse a los antinutrientes y reducir sus efectos negativos (Song et al., 2021).

En los últimos años, las prolaminas se han aplicado en el campo de los materiales debido a su característica de autoensamblaje, alta hidrofobicidad y biocompatibilidad; son adecuadas para la elaboración de fibras, nanopartículas y agentes emulsionantes (Abdullah et al., 2024; Tapia-Hernández et al., 2019). Adicionalmente, representa un grupo de aditivos alimentarios biocompatibles, biodegradables y sostenibles, las prolaminas más comunes en fracciones son: kafirina, gliadina, zeína; fueron estudiadas por que forman partículas coloidales por la propiedad anfifílica y pueden auto ensamblarse en micro y nanopartículas, son complejos bicatenarios y ternarios, que tienen propiedades estables al combinarse con polisacáridos, proteínas solubles, polifenoles y tensioactivos (Song et al., 2021; Zheng & Zhang, 2019).

2.3.3. Prolaminas en la dieta de pacientes celíacos

La enfermedad celíaca es una patología autoinmune crónica desencadenada por la ingestión de gluten, una proteína compleja presente en cereales como el trigo, la cebada y el centeno. Esta enfermedad afecta a un porcentaje significativo de la población y se caracteriza por la reacción inmunológica anormal a las prolaminas, un grupo de proteínas ricas en prolina y glutamina presentes en el gluten (Scherf et al., 2020). A pesar de que se ha demostrado que las gliadinas, una clase de prolaminas del trigo, son los principales antígenos responsables de la respuesta inmunológica en pacientes celíacos, la comprensión de la importancia de todas las prolaminas en la dieta de estos pacientes está siendo objeto de una creciente atención científica (Scherf et al., 2021).

Las prolaminas son esenciales para la germinación de las semillas de cereales y actúan como reservas de nutrientes. En el contexto de la enfermedad celíaca, las prolaminas son reconocidas por el sistema inmunológico como antígenos extraños, lo que desencadena una respuesta inmunológica inflamatoria en el intestino delgado de los pacientes celíacos (Gell et al., 2017). Las prolaminas, incluidas las gliadinas, inducen una cascada de eventos inmunológicos que resultan en daño a la mucosa intestinal, manifestando síntomas clínicos y complicaciones diversas (Eggenreich et al., 2018).

Es crucial resaltar que diferentes cereales contienen diversos tipos de prolaminas, cada una con una estructura de aminoácidos única. La variabilidad en la estructura de las prolaminas contribuye a la diversidad de respuestas inmunológicas observadas en pacientes celíacos. Mientras que las gliadinas del trigo son conocidas por ser altamente inmunogénicas, otras prolaminas presentes en otros cereales también pueden desencadenar respuestas inmunológicas en ciertos individuos, esta complejidad resalta la necesidad de tener presente la acción de las prolaminas en la dieta de los pacientes celíacos (Sollid et al., 2020).

En este contexto, la quinua (*Chenopodium quinoa*) emerge como una opción dietética prometedora para los pacientes celíacos. A pesar de que las prolaminas de la quinua no son idénticas a las gliadinas del trigo (Sollid et al., 2020), la evaluación de su inmunogenicidad es crucial. Estudios preliminares indican que las prolaminas de la quinua pueden tener una menor capacidad para desencadenar respuestas inmunológicas adversas en comparación con las prolaminas del trigo. Esto sugiere que la quinua podría ser una alternativa segura y nutritiva en la dieta de los pacientes celíacos (Bancel et al., 2019).

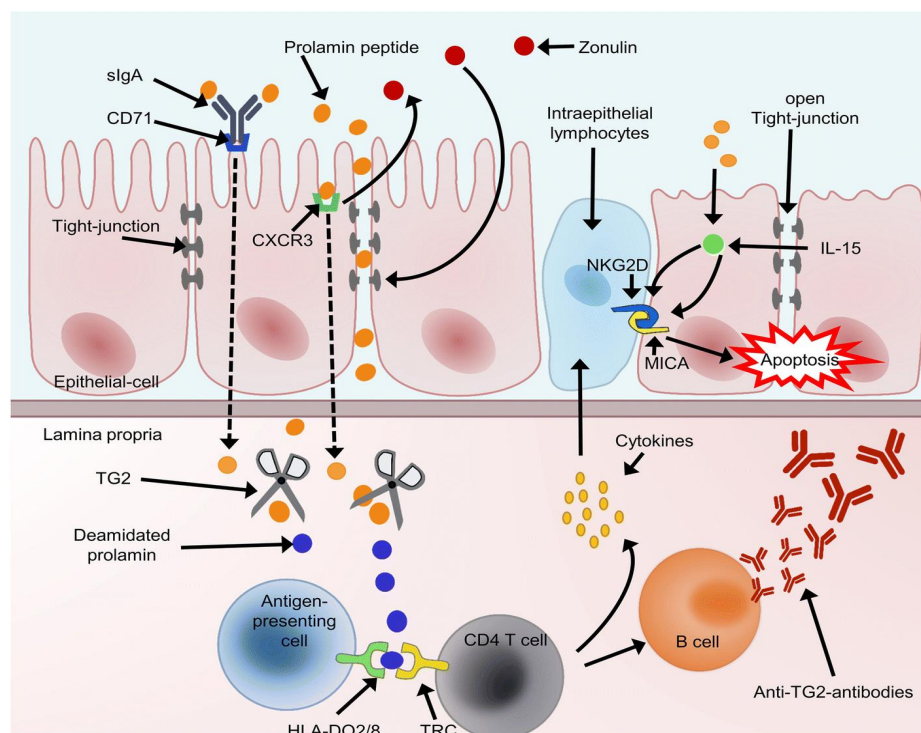


Figura 1. Adaptación simplificada de la patogénesis de la enfermedad de pacientes celíacos (Eggenreich et al., 2018).

2.4. Extracción de proteínas

2.4.1. Método de extracción modificado de Osborne y Mendel

El método de Osborne es un procedimiento de fraccionamiento de proteínas que

se utiliza para separar y cuantificar los distintos tipos de proteínas presentes en una muestra. Este método fue desarrollado por Thomas B. Osborne y Lafayette B. Mendel en la Universidad de Yale en 1914. El fraccionamiento de proteínas se basa en la solubilidad de las mismas en distintos disolventes, y consta de tres fracciones principales: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas.

Las albúminas son las proteínas más solubles y se separan mediante la adición de agua a la muestra. Las globulinas son menos solubles y se separan mediante la adición de soluciones salinas fuertes neutras. Finalmente, las prolaminas - glutelinas son las proteínas menos solubles y se separan mediante la adición de etanol o soluciones ácidas o básicas (Osborne, 1924). El resultado final es una separación de las proteínas en cuatro fracciones con características distintas, este método se fundamenta en la relación estructura-solubilidad de las proteínas (Van de Vondel et al., 2020).

El método de Osborne ha sido ampliamente utilizado en la investigación de proteínas de origen vegetal, como en la quinua (Vega-Gálvez et al., 2010b) y la cebada (Phillips, 2013), además de su utilidad para la identificación y cuantificación de proteínas, también ha sido utilizado para estudios de digestibilidad, funcionalidad y propiedades nutricionales de las mismas (Day et al., 2022).

2.4.2. Electroforesis

La técnica de electroforesis es una metodología de laboratorio que es usada para la separación de ADN, proteínas o ARN en base a su carga eléctrica y tamaño de las moléculas migran de un ánodo a un cátodo, es dependiente a la fuente de poder para mover las moléculas a través de la matriz; la porosidad de la matriz de gel dependerá de la gradiente de acrilamida o poliacrilamida (bis acrilamida + poliacrilamida) y permitirá que moléculas pequeñas se trasladen más rápido que las grandes en el gel para determinar el peso molecular (kDa) de las muestras, paralelamente se usa los estándares o marcadores moleculares de tamaños conocidos que son separados en el mismo gel y son comparados con la muestra problema. El gel es teñido para revelar las bandas y visualizarla para su correspondiente interpretación (Foxman, 2012).

a) Separación electroforética de proteínas

La electroforesis es usada para separar proteínas de mezclas complejas, por ejemplo: de células, fracciones subcelulares, columnas fraccionales o Inmunoprecipitados, para investigar subunidades composiciones o verificar la

homogeneidad o la diversidad de muestras proteicas, esto también puede servir para purificar proteínas y su uso en futuras aplicaciones (Chakavarti & Chakavarti, 2008). La separación y purificación de proteínas son necesarias para llevar a cabo el estudio y caracterización del proteoma de los sistemas biológicos. Para ello, éstas deben ser separadas selectivamente a partir de muestras complejas mediante un procedimiento de fraccionamiento adecuado. Los métodos de separación se basan en diferentes características de las proteínas tales como solubilidad, tamaño o carga, entre otras. Una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis (Kurien et al., 2019).

Electroforesis en gel de proteínas es un procedimiento muy indispensable e importante que se debe llevar a cabo en el estudio de proteínas. Las partes más críticas, como la elución y recuperación de proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS). Este proceso consiste en localizar nuestra proteína de interés en la matriz, eluir la proteína, eliminar el SDS de la muestra líquida y, finalmente, renaturalizar la proteína con marcadores (Kurien et al., 2019). Además, poseen una serie de ventajas tales como: ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerzas iónicas; fáciles de generar mediante la polimerización de acrilamida (Li et al., 2012).

El SDS, es un detergente que está compuesto por 12 átomos, de carga negativa, al aplicar carga eléctrica a la muestra proteína-SDS, este complejo se traslada al polo positivo de la cámara electroforética, esta técnica fue descrita por primera vez por Laemmli y hasta la actualidad, son casi mínimos los cambios que se hicieron a esta técnica (Carrillo, 2012).

b) Electroforesis en gel SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel primera dimensión, también conocida como “One-dimensional Gel Electrophoresis” (1D-GE), es una técnica avanzada en biología y en proteómica para separar y visualizar proteínas presentes en muestras biológicas complejas (Zhan et al., 2018) y poder caracterizarlas según su distancia de migración y la resolución de las matrices de SDS-PAGE.

Las proteínas son separadas por su peso molecular utilizando una técnica conocida en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) (Kurien et al., 2019). En esta etapa, el traslado de las proteínas a través del gel debido a la aplicación de un campo eléctrico y son frenadas por la resistencia del gel, dado que el dodecil sulfato de sodio (SDS) se une a las proteínas dándoles una carga negativa en proporción a su peso, la separación se logra en función al tamaño (Lee et al.,

2020).

Convencionalmente, las configuraciones de SDS-PAGE utilizan geles de dimensiones aproximadas de 20 x 20 cm. Sorprendentemente, esta configuración facilita la separación de un número sustancial de proteínas, a menudo superando las 10,000. Los métodos de detección se adaptan a la cantidad de proteína presente. Cuando las concentraciones de proteína son alrededor de 10 ng, es habitual la aplicación de tinte de Coomassie (Oliveira et al., 2014). Por el contrario, si la concentración de proteína es de aproximadamente 0,5 ng, la detección se puede llevar a cabo utilizando tinciones de plata o tinciones fluorescentes de proteínas totales. Al implementar este sistema integral, es posible obtener conocimientos detallados sobre el intrincado mundo de la composición y expresión de proteínas (Molina-Mora et al., 2020).

La técnica de electroforesis permite una resolución excepcional de cientos a miles de proteínas en una sola muestra, lo que lo hace idóneo para estudios comparativos de expresión proteica en diversos contextos biológicos, como investigaciones sobre enfermedades en respuesta a estímulos, como lo es la prolamina en pacientes celíacos (Daly et al., 2020).

2.5. Cuantificación de proteínas

Las proteínas ya procesadas y separadas por técnicas de electroforesis pasan al siguiente paso de la determinación de la concentración de estas mismas, son visualizadas mediante diferentes tinciones: nitrato de plata, azul de Coomassie o por fluorescencia. La aplicación de azul de Coomassie, presenta una sensibilidad de hasta 50 ng de proteína (Carrillo, 2012).

2.6. Método de tinción de Bradford

La reacción de Bradford es un método común y efectivo para cuantificar proteínas utilizando espectrofotometría. Esta reacción se basa en la capacidad de las proteínas para unirse a un tinte, el azul de Coomassie, en una proporción directamente proporcional a su concentración (Kielkopf et al., 2020). El azul de Coomassie en su forma original tiene una absorbancia máxima a alrededor de 570 nm. Sin embargo, cuando se une a proteínas, experimenta un cambio de color de marrón a azul intenso, lo que resulta en un cambio en la absorción máxima hacia aproximadamente 595 nm (Simonian & Smith, 2006).

La cuantificación de proteínas mediante espectrofotometría UV es una técnica ampliamente utilizada para determinar la concentración de proteínas en una muestra basándose en su capacidad para absorber luz en la región ultravioleta -

visible del espectro electromagnético. El fundamento de esta técnica se basa en la absorbancia diferencial de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas, que muestran una absorbancia máxima alrededor de 280 nm debido a los grupos aromáticos de los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina (Rocha & Teixeira, 2004)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga correspondiente al departamento de Ayacucho.

3.1.1. Ubicación política

País : Perú
Región : Ayacucho
Provincia : Huamanga
Distrito : Ayacucho

3.1.2. Ubicación geográfica

El Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Ubicación : Jr. Independencia S/N
Latitud sur : 13° 08' 44,04"
Longitud oeste: 74° 13' 15,85"
Altitud : 2791 m s.n.m.

3.2. Población

Constituidas por 4 accesiones de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd que crecen en los distritos de Vilcas Huamán, Chiara y Acocro de la región de Ayacucho.

3.3. Muestra

1,5 g de harina de 4 accesiones de semillas secas de *Chenopodium quinoa* Willd.

3.4. Etapa I: Preparación de la muestra

La obtención de las muestras de análisis de *Chenopodium quinoa* Willd fueron procedente de los distritos Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, se usó la metodología

de Barba de la Rosa et al., 2009.

Las impurezas son un factor que limita de manera importante la investigación debido a que pueden originar pérdidas significativas de reactivos, muestra y otros. Adicionalmente, pueden ser una fuente de sesgos que impidan cumplir los objetivos trazados.

Para proceder a procesar las muestras es importante una selección mecánicamente de las 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd.

a) Limpieza

Mediante un proceso minucioso de limpieza se proceden a retirar las pajillas, tallos, hojas, arena u otros elementos ajenos a las semillas de las 4 accesiones de quinua roja, negra, amarilla y blanca; este proceso se lleva con la debida protección como el uso de guantes para evitar el contacto de las proteasas presentes en las manos con las semillas.

b) Selección

Escoger los granos únicamente pertenecientes a la accesión correspondiente y que tengan apariencia íntegra.

c) Molienda

El molido tiene que ser fino en una moledora o en un mortero, que sea lo más fino posible de hasta 2 mm, conservar a condiciones de oscuridad y temperatura ambiente.

3.5. Etapa II: Extracción de proteínas - Método modificado de Osborne

Una vez obtenidas las 12 muestras de quinua se procedió a pesar 1,5 g de harina en 12 tubos de vidrio de 10 mL adicionando 5 mL de n-Hexano, luego fueron agitadas por 24 h a 150 rpm.

Pasada las 24 h, se llevó los tubos a centrifugación a 3500 rpm por 30 min, se recuperó el sobrenadante para un análisis posterior de lípidos; dejar los tubos abiertos por 24 h para la total evaporación de trazas de n-Hexano (anexo 16; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

3.5.1. Extracción de albúminas

Se resuspendió la harina deslipidizada con 5 ml de NaCl al 10 %, ajustado a pH 3. Posterior a ello, se homogenizó las 12 muestras al vórtex por 10 min. Se colocó al agitador orbital a 150 rpm durante 1 h a 4 °C. Se centrifugó a 3500 rpm por 30 min a 4°C (anexo 2).

Se procedió a hacer el lavado por 3 veces, se desechó cada sobrenadante de cada lavada que contiene dicha fracción proteica.

3.5.2. Extracción de Globulinas 7s

Se resuspendió el sedimento con 5 mL de solución Na_2HPO_4 a 10 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0,1 M y ajustar a 7,5 pH.

Posterior a ello, se homogenizó las 12 muestras al vórtex por 10 min. Se colocó al agitador orbital a 150 rpm durante 1 h a 4 °C. Se centrifugó a 3500 rpm por 30 min a 4°C (anexo 2). Se desechó el sobrenadante.

3.5.3. Extracción de Globulinas 11s

Se resuspendió el sedimento con 5 mL de solución Na_2HPO_4 a 10 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0,8 M, ajustar a 7,5 pH

Posterior a ello, se homogenizó las 12 muestras al vórtex por 10 min. Se colocó al agitador orbital a 150 rpm durante 1 h a 4 °C. Se centrifugó a 3500 rpm por 30 min a 4°C (anexo 2). Se desechó el sobrenadante.

3.5.4. Extracción de Prolaminas

Se resuspendió el sedimento con 5 mL de solución helada de 2-propanol al 70 %.

Posterior a ello, se homogenizó las 12 muestras al vórtex por 10 min. Se colocó al agitador orbital a 150 rpm durante 1 h a 4 °C. Se centrifugó a 3500 rpm por 30 min a 4 °C (anexo 2).

Se reservó el sobrenadante en tubos autoclavados y limpios para su posterior análisis.



Figura 2. Reactivos para el fraccionamiento de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua". Ayacucho 2024.

3.6. Etapa III: Concentración de proteínas

- Para la concentración de proteínas se tomó 0,5 mL del sobrenadante previamente agitadas de cada accesión y se mezcló con 1,5 mL de acetona congelada.

- Ambas soluciones se agitaron manualmente por 1 min hasta que la mezcla tenga una opacidad, debido a la precipitación de proteínas.
- Se centrifugó a 3500 rpm por 20 min desechar el sobrenadante y coleccionar el pellet en tubos Eppendorf
- Se resuspendió el pellet en 1000 μL de H_2O destilada y autoclavada, se refrigeró para su futuro análisis.

3.7. Etapa IV: Cuantificación de proteínas por método de Bradford

Para la curva estándar se utilizó estándar de Albúmina sérica bovina (BSA) como proteína de referencia en 0,1 mg/mL, usando el agitador magnético para su homogenización, se usó el Azul Brillante de Commassie G-250, buffer fosfato a pH 7,2 como diluyente, etanol al 95 % y ácido fosfórico al 88 %. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas mediante el espectrofotómetro Genesys10s UV-visible a 595 nm, esto para la elaboración de la curva de calibración y determinar la concentración de proteínas de las muestras problemas.

Tabla 2. Dilución seriada de estándares de BSA para la curva de calibración por el método de Bradford.

Estándar	Volumen BSA (μL)	Concentración BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$\text{H}_2\text{O}_{\text{BD}}$ (μL)	Reactivo Bradford (μL)
Estándar 0	0	0	800	
Estándar 1	10	0,001	790	
Estándar 2	20	0,002	780	
Estándar 3	40	0,004	760	
Estándar 4	60	0,006	740	200
Estándar 5	80	0,008	720	
Estándar 6	100	0,010	700	
Estándar 7	150	0,015	650	

- Se sometió a vórtex los tubos y se dejó en reposo en total oscuridad por 20 min.
- Los estándares se colocaron en cubetas para espectrofotometría a una lectura de 595nm y se procedió con la lectura de las absorbancias para determinar la curva de calibración.
- Cada estándar se preparó con triple repetición para asegurar la fiabilidad, sensibilidad y precisión.
- Este mismo protocolo se aplicó con las muestras proteicas y se calcularon las concentraciones por interpolación en base a la recta obtenida de la curva de absorción.

3.8. Etapa V: Preparación de muestras proteicas y armado de matriz electroforética

3.8.1. Preparación de proteínas

- Se tomó 30 μL de proteína de cada accesión y se les añadió a 10 μL de tampón de carga (4x) y se homogenizó.
- Se sometieron las muestras a temperatura de 99 °C por 5 min para formación de los complejos con las proteínas.
- Posterior a los 5 min, se retiró las muestras y se sometió a un shock térmico, colocando las muestras a 4 °C hasta el proceso de electroforesis.

3.8.2. Ensamblaje de matriz para electroforesis

El análisis por electroforesis se realizó en geles denaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) según Laemmli (1970) modificado.

- Se ensambló la matriz con dos placas de vidrio transparente, dos espaciadores con un grosor de 0,75 mm, un peine con 15 entradas que facilitó la formación de pocillos para la siembra de muestras, un tanque de electroforesis, una cubierta con el ánodo y cátodo y una fuente de poder.
- Los separadores se colocaron a los extremos distales entre las placas, se colocó el cinto de plástico a los bordes para evitar derrames de poliacrilamida, un par de ganchos sujetadores tanto a los lados como en la base y se añadió los geles (separador y concentrador). En la figura 2 se indica los componentes del equipo de electroforesis.

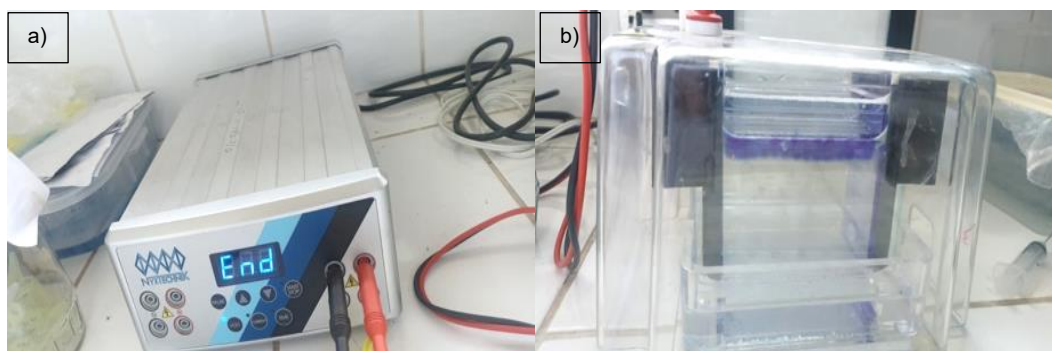


Figura 3. (a) Cámara de electroforesis conectada a la fuente de poder; (b) matriz ensamblada con placas de vidrio.

3.9. Etapa VI: Preparación y corrida de geles SDS-PAGE

- Se preparó los reactivos para los geles de separador y concentrador (anexo 4)

Tabla 3. Concentraciones de reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida

Reactivos	Gel separador 15 %	Gel concentrador 5 %
H ₂ O _{bd}	1,1 mL	0,98 mL
Bis/acrilamida	2,5 mL	0,38 mL
Tris-base 1,5M, pH 8,8	1,3 mL	0,34 mL
SDS 10 %	50 µL	50 µL
APS 10 %	25 µL	25 µL
TEMED	5 µL	3 µL

- Se prepara en primer lugar el gel separador a un volumen aproximado de 5 mL para 1x que es equivalente para una matriz de electroforesis.
- Se deja reposar a temperatura ambiente por 20 min hasta la polimerización del gel separador.
- Una vez polimerizado añadir el gel concentrador, colocar el peine entre las placas y dejar polimerizar por 20 min.
- Una vez polimerizado el gel concentrador, se retiró el peine y todos los componentes de fijación de la matriz.
- Las placas con la matriz polimerizada se colocaron en la cámara de electroforesis embebiendo con buffer de corrida a un pH 7,5.
- Se procedió a sembrar 5 µL del marcador estándar WSHT MKp007 en un pocillo con una separación de un pocillo adicional como espacio entre el marcador y las muestras para evitar contaminaciones.
- Se sembró 10 µL de las muestras problemas.
- Se procedió a cubrir la cámara, se conectó a la fuente de poder a 180 V durante 80 min.
- Pasado el tiempo de corrida, se desconectó los electrodos una vez que la fuente de poder se haya apagado, se desmontó la cámara de electroforesis y la matriz, separando las placas de vidrio con cuidado así evitar la ruptura del gel.
- Se hizo una pequeña muesca al borde inferior del gel para ubicar el orden en que fueron sembradas las muestras.
- El buffer de electroforesis o de corrida fue devuelta al frasco original para una posterior corrida, puede ser usado hasta 6 veces.
- Las placas de vidrio, la liga hermética, los espaciadores y el peine fueron lavados con abundante agua para remover trazas de poliacrilamida y/o muestras.

3.10. Etapa VII: Coloración y revelado de proteínas

- Se sumergió el gel de poliacrilamida en un envase de plástico de tamaño 20 cm x 30 cm, conteniendo la solución de coloración azul brillante de Coomassie hasta cubrir completamente el gel por 35 min a 100 rpm (anexo 6).
- Pasado el tiempo de incubación, devolver la solución de coloración a su frasco original.
- Se enjuagó el excedente de solución colorante con agua bidestilada autoclavada y se desechó.
- Se realizó la primera decoloración sumergiendo el gel en solución de decoloración por 1 hora en el agitador a 100 rpm, terminado el tiempo se descarta la primera solución de decoloración en un envase aparte para su posterior neutralización para su reutilización.
- Se realizó la segunda decoloración repitiendo el proceso anterior en agitación *overnight*.

3.11. Análisis estadístico

Los datos son presentados en tablas y gráficos mostrando los principales estadísticos descriptivos de tendencia central, dispersión y de desviación estándar.

IV. RESULTADOS

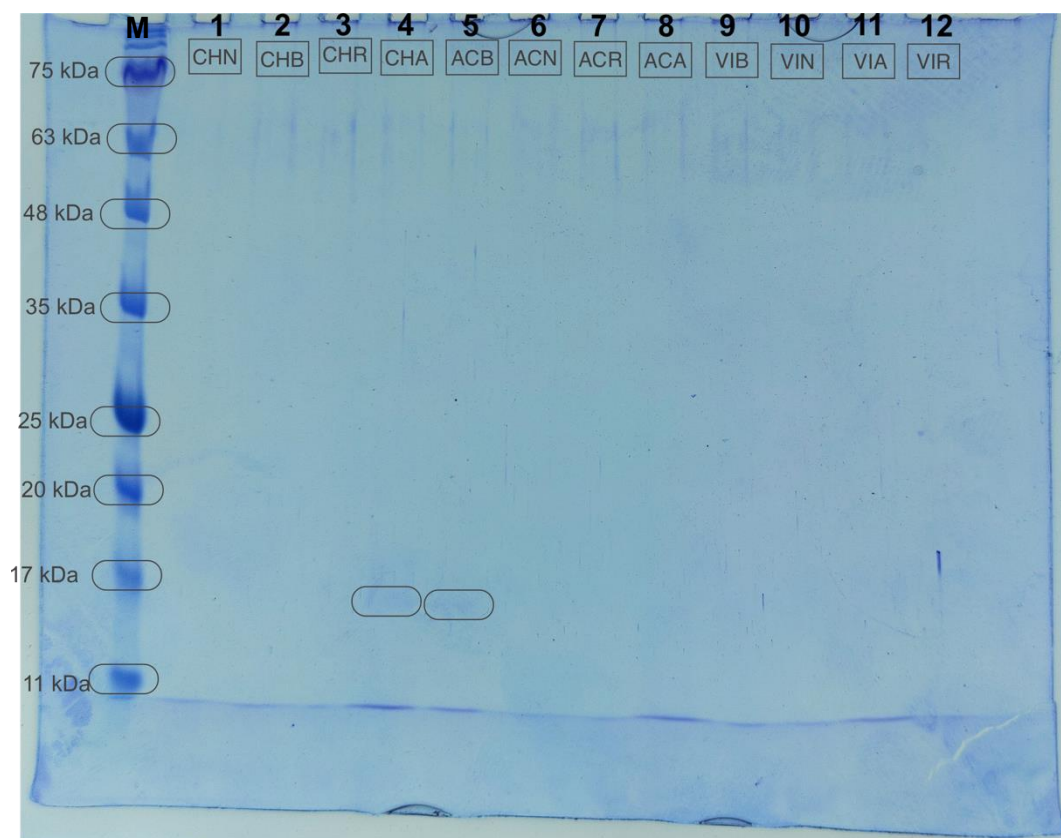


Figura 4. Señalización de bandas en electroforesis SDS-PAGE de prolaminas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) al 15 %. Carril: M, MP (WSHT MKP007), carril 1, 2, 3 y 4 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Chiara; 5, 6, 7 y 8 accesión blanca, negra, roja y amarilla de Acocro; 9, 10, 11 y 12 accesión blanca, negra, amarilla y roja de Vilcas Huamán; réplica N° 1

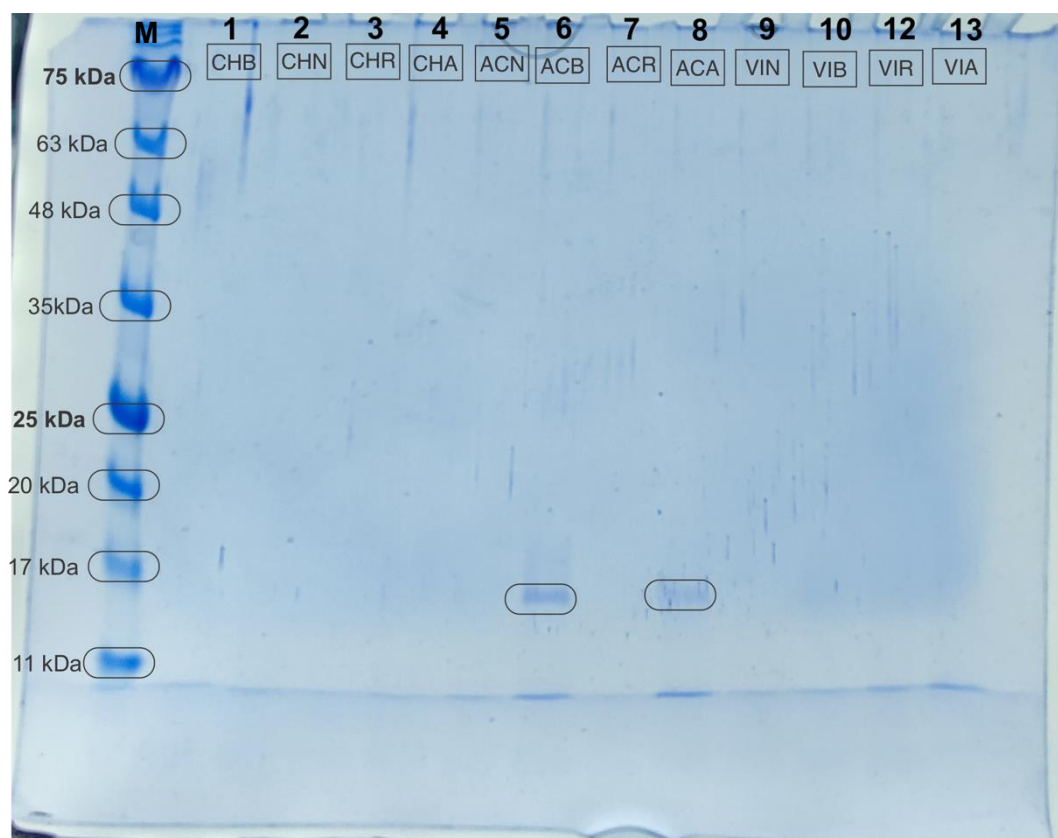


Figura 5. Señalización de bandas en electroforesis SDS-PAGE de prolaminas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) al 15 %. Carril: M, MP (WSHT MKP007), carril 1, 2, 3 y 4 accesión blanca, negra, roja y amarilla de Chiara; 5, 6, 7 y 8 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Acocro; 9, 10, 11 y 12 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Vilcas Huamán; réplica N° 2.



Figura 6. Señalización de bandas en electroforesis SDS-PAGE de prolaminas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) al 15 %. Carril: M, MP (WSHT MKP007), carril 1, 2, 3 y 4 accesión blanca, negra, roja y amarilla de Chiara; 5, 6, 7 y 8 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Acocro; 9, 10, 11 y 12 accesión negra, blanca, roja y amarilla de Vilcas Huamán; réplica N° 3.

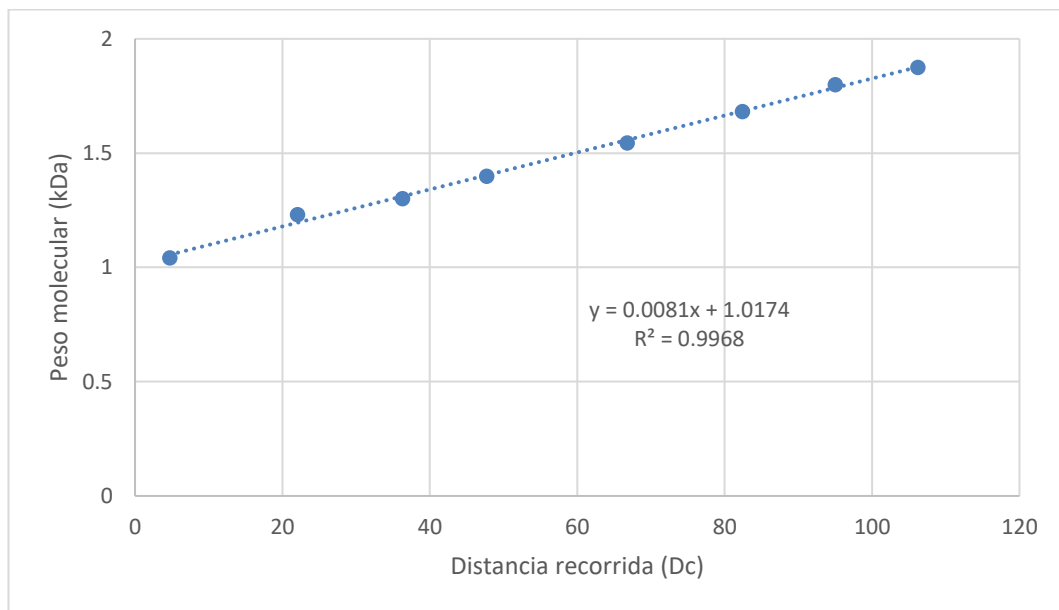


Figura 7. Linealización de los estándares de peso moleculares (kDa) con su distancia de recorrido (Dc), réplica N° 1

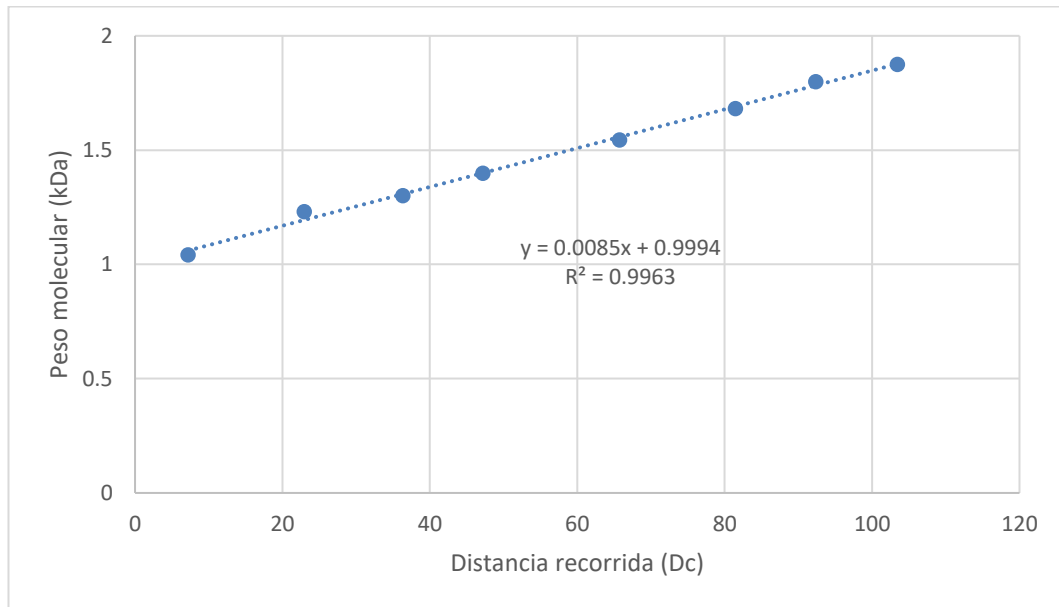


Figura 8. Linealización de los estándares de peso moleculares (kDa) con su distancia de recorrido (Dc), réplica N° 2.

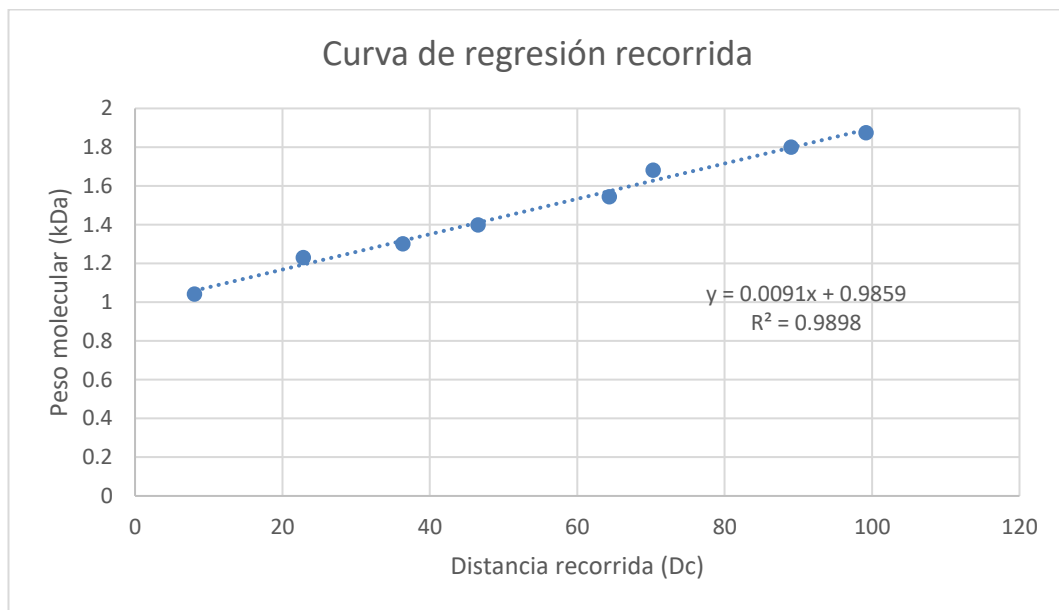


Figura 9. Linealización de los estándares de peso moleculares (kDa) con su distancia de recorrido (Dc), réplica N° 3.

Tabla 4. Estimación de pesos moleculares de prolaminas en 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" provenientes de los distritos de Vilcas Huamán (VI-), Acocro (AC-) y Chiara (CH-), Ayacucho 2024.

Lugar	Accesión	Banda	Peso molecular (kDa)
Vilcas Huamán	Blanca (VIB)	1	14
		2	13
		3	11
	Negra (VIN)	1	13
		2	11
	Amarilla (VIA)	1	15
Acocro	Blanca (ACB)	1	15
		2	17
		3	14
		4	13
		5	12
	Negra (ACN)	1	14
		2	15
		3	14
	Amarilla (ACA)	4	13
		5	12
		6	11
	Roja (ACR)	1	15
Chiara	Blanca (CHB)	1	14
	Negra (CHN)	1	14
		1	16
	Amarilla (CHA)	2	14
		3	13
		4	11
	Roja (CHR)	1	14

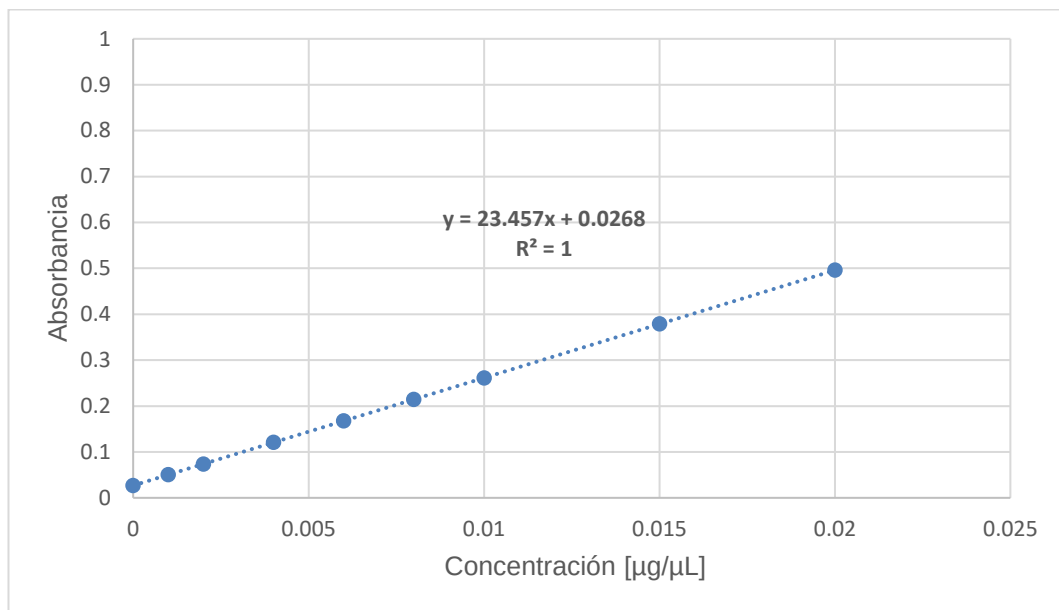


Figura 10. Linealización de la absorbancia del estándar BSA frente a la concentración (µg/µL)

Tabla 5. Cuantificación de prolaminas de 4 accesiones con 3 réplicas *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" mediante la técnica de Bradford provenientes del distrito de Vilcas Huamán (VI-), Ayacucho 2024.

Lugar	Muestra	Réplica	ABSORBANCIAS			Promedio de	[Prola	[Prola
			Repeticiones			absorbancias	minas]	minas]
						(A) 595	(µg/µL)	(mg/kg)
Vilcas Huamán	Blanca (VIB)	1	0,043	0,048	0,042	0,044	0,0007	0,747
		2	0,057	0,053	0,051	0,054	0,0011	1,145
		3	0,052	0,055	0,059	0,055	0,0012	1,216
	Negra (VIN)	1	0,030	0,026	0,028	0,028	0,0001	0,051
		2	0,008	0,009	0,008	0,008	-	-
		3	0,021	0,022	0,021	0,021	-	-
	Amarilla (VIA)	1	0,067	0,070	0,063	0,067	0,0017	1,700
		2	0,062	0,059	0,063	0,061	0,0015	1,472
		3	0,068	0,068	0,065	0,067	0,0017	1,714
	Roja (VIR)	1	0,039	0,041	0,043	0,041	0,0006	0,611
		2	0,035	0,031	0,033	0,033	0,0003	0,260
		3	0,058	0,052	0,057	0,056	0,0012	1,231

Tabla 6. Cuantificación de prolaminas de 4 accesiones con 3 réplicas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" mediante la técnica de Bradford provenientes del distrito de Acocro (AC-), Ayacucho 2024.

Lugar	Muestra	Réplica	ABSORBANCIAS			Promedio de absorbancias (A) 595	[Prola minas] (µg/µL)	[Prola minas] (mg/kg)
			Repeticiones					
Acocro	Blanca (ACB)	1	0,100	0,091	0,099	0,097	0,0030	2,980
		2	0,054	0,055	0,050	0,053	0,0011	1,118
		3	0,036	0,032	0,037	0,035	0,0003	0,337
	Negra (ACN)	1	0,058	0,064	0,053	0,058	0,0013	1,344
		2	0,023	0,021	0,025	0,023	-	-
		3	0,027	0,020	0,024	0,024	-	-
	Amarilla (ACA)	1	0,146	0,134	0,138	0,139	0,0048	4,802
		2	0,087	0,077	0,083	0,082	0,0024	2,363
		3	0,041	0,044	0,042	0,042	0,0007	0,662
	Roja (ACR)	1	0,044	0,047	0,042	0,044	0,0007	0,747
		2	0,089	0,082	0,085	0,085	0,0025	2,495
		3	0,036	0,035	0,039	0,037	0,0004	0,421

Tabla 7. Cuantificación de prolaminas de 4 accesiones con 3 réplicas de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" mediante la técnica de Bradford provenientes del distrito de Chiara (CH-), Ayacucho 2024.

Lugar	Muestra	Réplica	Absorbancias			Promedio de absorbancias (A) 595	[Prola minas] (µg/µL)	[Prola minas] (mg/kg)
			Repeticiones					
Chiara	CHB	1	0,024	0,022	0,021	0,022	-	-
		2	0,020	0,023	0,021	0,021	-	-
		3	0,034	0,037	0,036	0,036	0,0004	0,3780
	CHN	1	0,038	0,036	0,038	0,037	0,0004	0,4490
		2	0,016	0,017	0,014	0,016	-	-
		3	0,029	0,021	0,025	0,025	-	-
	CHA	1	0,068	0,035	0,039	0,047	0,0009	0,8754
		2	0,047	0,043	0,040	0,043	0,0007	0,7048
		3	0,055	0,052	0,050	0,052	0,0011	1,0885
	CHR	1	0,034	0,039	0,035	0,036	0,0004	0,3922
		2	0,035	0,067	0,031	0,044	0,0007	0,7475
		3	0,035	0,032	0,027	0,031	0,0002	0,1933

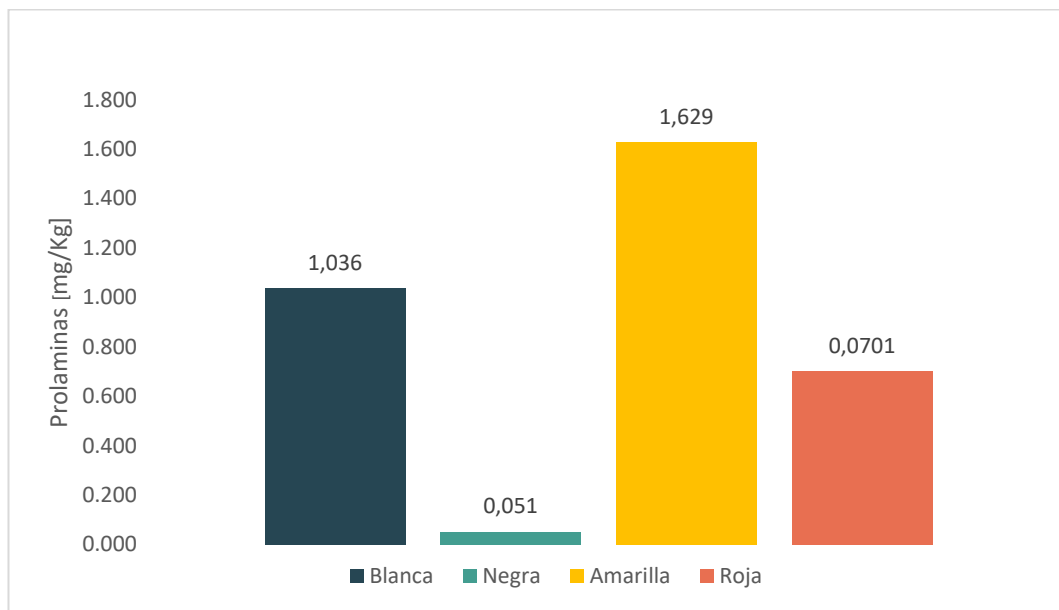


Figura 11. Comparación de prolaminas en 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" del distrito de Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.

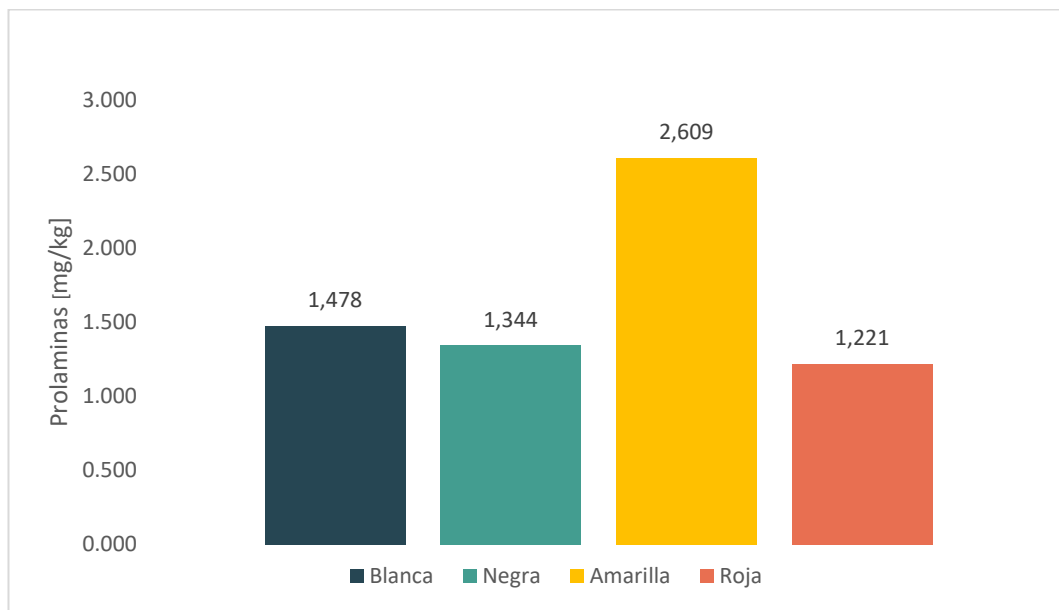


Figura 12. Comparación de prolaminas en 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" del distrito de Acocro, Ayacucho 2024.

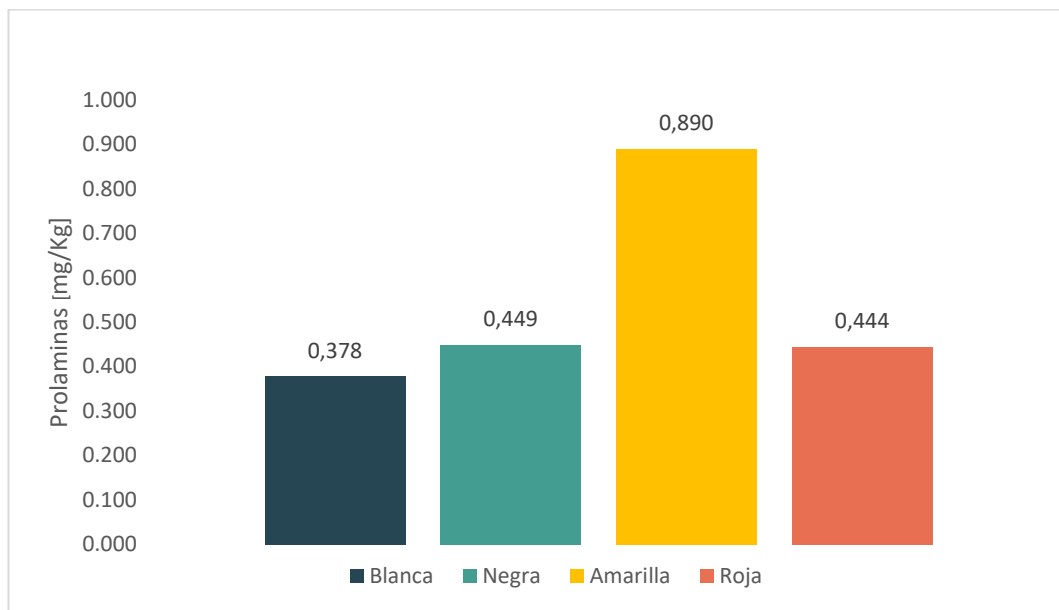


Figura 13. Comparación de prolaminas en 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" del distrito de Chiara, Ayacucho 2024

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos revela importantes variaciones en las concentraciones de prolaminas entre diferentes accesiones y entre los lugares de origen de recolección de *Chenopodium quinoa* Willd. La prolamina, es una de las fracciones de proteínas que componen la fuente de reserva en las semillas de quinua, así como del trigo, maíz y la cebada. Mu et al. (2023) reconoce que en proporciones de 35, 37, 9 y 15 % de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas respectivamente están presentes en la semilla de quinua a comparación con cereales de uso tradicional como el trigo, donde las prolaminas constituyen un 80% del total de proteínas, contradiciendo a Burrieza et al. (2020), quien tomó como muestra de evaluación una variedad representativa de 4 países (Ecuador, Perú, Bolivia y Chile) siendo insuficiente en la colecta y análisis de data, ya que sólo en el Perú existe más de 3 mil ecotipos, 20 variedades comerciales y 4 accesiones reconocidos por el MINAGRI y la FAO a cargo de Apaza Mamani et al. (2013) y afianzando el presente trabajo de investigación y sus respectivos reportes.

Lo particular en nuestro estudio muestra que la cuantificación de prolaminas en las cuatro accesiones de quinua arrojó valores de 0,051 mg/kg hasta 2,609 mg/kg, que refleja la variabilidad, estos resultados concuerdan con estudios previos que reportan la presencia de fracciones proteicas, sin excluir la prolamina, que no solo varía entre accesiones, sino también de su ambiente de desarrollo; como indica Zevallos et al. (2012), quién analizó 15 tipos de quinuas, de los cuales 4 de ellos presentaron concentraciones cuantificables de epítomos tóxicos estimulando líneas de células T a niveles similares a las reacciones de la gliadina (trigo), la mayoría de accesiones de quinua no poseen cantidades cuantificables de epítomos.

La cuantificación de proteínas se determinó en base a la metodología descrita por

Bradford, se utilizó una curva de linealización de estándares de BSA (albúmina sérica bovina) la concentración de la solución patrón fue 0,1mg/mL y la lectura de absorbancia fue a 595 nm (Compton & Jones, 1985). Los resultados al comparar las 4 accesiones se destaca la clara tendencia que la accesión amarilla exhibió la concentración más alta de prolaminas, seguida por blanca, roja y negra de todas las localidades. Las accesiones de quinua amarilla entre las réplicas y repeticiones de las diferentes localidades (Tabla 5, Tabla 6 y Tabla 7) siendo en la localidad de Acocro un 2,609 mg/kg (Figura 12) lo cual es significativamente superior al contenido en Vilcas Huamán, 1,478 mg/kg y Chiara, 0,890 mg/kg; dando vestigios de la interacción de factores genéticos y las condiciones ambientales que favorecieron la síntesis de esta proteína.

Por otro lado, la accesión blanca también mostró altos valores, específicamente de la zona de Acocro (1,478 mg/kg), la accesión negra reporta valores bajos en Vilcas Huamán y un con mayor contenido en Acocro, 0,051 mg/kg y 1,344 mg/kg respectivamente, mientras que la accesión roja mostró un patrón intermedio con valores altos en Acocro y más bajos en Chiara con 1,221 mg/kg y 0,444 mg/kg respectivamente. Estos datos sugieren que la variabilidad en el contenido de prolaminas puede estar relacionada con las condiciones de cultivo, así como la disponibilidad de nutrientes, agua y la altitud (Rizzo et al., 2023). Estas variaciones sugieren una influencia genética en la expresión de prolaminas en la quinua, lo cual es coherente con estudios previos que indican una correlación entre mayores concentraciones de prolaminas y un mayor riesgo de desencadenar respuestas inmunológicas en pacientes celíacos.

Con respecto al perfil electroforético, el protocolo para el fraccionamiento según Osborne tuvo modificaciones sustanciales tanto en metodología, solventes, tiempo de deslipidización, el fraccionamiento y extracción de albúminas, globulinas; esto para obtener concentraciones lo más cercano a prolaminas, así para su adecuado análisis como ha reportado Barba de la Rosa et al., 2009; Maldonado-Cervantes et al. 2010 y las modificaciones de extracción de Rodríguez et al., 2011, de esta manera en las Figura 4, Figura 5 y Figura 6 se observan las 3 réplicas de los geles de poliacrilamida, bandas de bajo peso molecular que fueron solubles en 2-propanol al 70 % y en la Tabla 4, la estimación de pesos moleculares de prolaminas obtenidas la linealización de los estándares de peso molecular del marcador de proteínas WSHT MKp007 mediante 3 réplicas con 3 repeticiones cada uno, Figura 7, Figura 8 y Figura 9. En la accesiones obtenidas

de Vilcas Huamán mostraron 7 bandas con pesos de 14, 13 y 11 kDa, indicando una mayor similitud entre las accesiones negras y blancas; en Acocro se muestra 13 bandas con pesos de 11 kDa hasta los 17 kDa, señalando la accesión amarilla quien tiene un perfil mucho más complejo con múltiples bandas; por consiguiente las accesiones de Chiara son idénticas en su perfil electroforético con 7 bandas que van desde los 11, 13, 14 y 16 kDa.

Obtener las similitudes entre los pesos moleculares observados (entre 11 y 17 kDa) sea repetitivo de manera constante en las tres réplicas y repeticiones indica que los resultados no son productos de errores técnicos o variaciones aleatorias en la electroforesis, bandas como de 15 kDa se encontró en Vilcas Huamán, Acocro y Chiara, demuestra que esta prolamina es una característica distintiva de estas accesiones, independientemente del lugar de origen; este resultado es avalada en diversos trabajos de investigación que moléculas >30 kDa corresponden a una óptima extracción y fácil interpretación (Barba de la Rosa et al., 1992; Segura-Nieto et al., 2002; Udaka et al., 2000; Xing et al., 2023). Estudios como este, que tienen como objetivo el cuantificar, comparar, determinar la correlación del contenido de prolaminas entre diferentes accesiones, la identificación de pesos moleculares libre de sesgo permite arribar a conclusiones confiables sobre la diversidad proteica.

Para los alimentos etiquetados como “*gluten-free*” son considerados en las proporciones menores de 20 mg/Kg (FAO, 2007; Scherf et al., 2021). A esta premisa surge una observación crítica al analizar más detenidamente los resultados obtenidos con la accesión amarilla. Esta accesión no solo exhibió en las 3 réplicas concentraciones cuantificables de prolaminas, que aun encontrándose son inocuas para el consumo poblacional, se determina que si hay presencia de prolaminas en las accesiones de quinua; sin embargo, el tema de contenido de prolaminas en *Chenopodium quinoa* Willd bajo las normativas del WGPAT (2011) indica la escasa información basada en investigaciones, este trabajo reforzará e incrementará el grueso de información necesaria.

Por último, el uso de réplicas y repeticiones fue fundamental para garantizar la precisión y confiabilidad de los resultados obtenidos en los diversos ensayos, este enfoque asegura que los pesos moleculares de las bandas detectadas son consistentes y representan lo más cercano posible a las proteínas reportadas de cada accesión, cuando se comparan el perfil electroforético con los datos cuantitativos del contenido de prolaminas (mg/kg) sugiere que la electroforesis

puede estar relacionada con una mayor concentración total de prolaminas lo que podría tener importantes implicaciones para su elección y uso en futuros estudio y aplicaciones biotecnológicas.

VI. CONCLUSIONES

1. Se cuantificó prolaminas en cuatro accesiones de *Chenopodium quinua* Willd “quinua” 0,051 mg/kg accesión negra y 1,629 mg/kg en accesión amarilla, ambas de localidad de muestreo de Vilcas Huamán; 2,609 mg/kg en accesión amarilla y 1,221 mg/kg en accesión roja, ambas de localidad de muestreo de Acocro ; 0,378 mg/kg en accesión blanca y 0,890 mg/kg en accesión amarilla, ambas de localidad de muestreo de Chiara, indicando que la mayor cantidad de prolaminas se encontró en Acocro, seguidas de Vilcas Huamán y de Chiara.
2. Se determinó el perfil electroforético de prolaminas en las accesiones blanca, negra, amarilla y roja de las localidades de Vilcas Huamán, Acocro y Chiara, con un total bandas de 7; 12 y 7 bandas respectivamente a los lugares de muestreo.
3. El contenido de prolaminas entre las cuatro accesiones de *Chenopodium quinua* Willd “quinua” de todas las zonas de muestreo indicaron mayor presencia de prolaminas en la accesión amarilla de Chiara, Vilcas Huamán y Acocro.
4. Los pesos moleculares estimados de prolaminas de *Chenopodium quinoa* Willd en blanca: 11 a 17; en negra: 11 a 14; en amarilla: 11 a 16 y en roja: 14 a 15 kDa respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios adicionales que comprometan la influencia de factores agroecológicos específicos en el contenido de prolaminas, para así poder entender mejor la variabilidad de prolaminas entre localidades.
- Incluir estudios de aminoácidos, para comprender la diversidad aminoacídica de las prolaminas de la quinua y su relación con las diferentes accesiones.
- Ampliar el análisis proteico de más accesiones sobre el papel de las prolaminas y la seguridad alimentaria.
- Profundizar estudios de las características fenotípicas y genotípicas y la relación con el contenido de prolaminas según el tipo de accesión.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, S., Moslehishad, M., & Salami, M. (2022). *Antioxidant and alpha-glucosidase enzyme inhibitory properties of hydrolyzed protein and bioactive peptides of quinoa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.189>
- Abdullah, null, Fang, J., Liu, X., Javed, H. U., Cai, J., Zhou, Q., Huang, Q., & Xiao, J. (2024). *Recent advances in self-assembly behaviors of prolamins and their applications as functional delivery vehicles*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(4), 1015–1042. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2113031>
- Abugoch James, L. E. (2009a). *Chapter 1 Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): Composition, Chemistry, Nutritional, and Functional Properties*. En *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 58, pp. 1–31). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1)
- Abugoch James, L. E. (2009b). *Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): Composition, chemistry, nutritional, and functional properties*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 58, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1)
- Agriculture and Food. (2018, octubre 23). *Nutritional aspects of quinoa [Text]*. <https://www.agric.wa.gov.au/irrigated-crops/nutritional-aspects-quinoa>
- Allende Ciballero, M. J. (2017). *Caracterización morfológica y molecular de accesiones de quinua (Chenopodium quinoa Willd.) Para estimar variabilidad genética* [Universidad Nacional Agraria La Molina]. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/2935/F30-A44-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2935>
- Amit, S., Irfan, A. M., Gaurav, S., Nalini, T., & Sarmad, M. (2021). *A review on medicinal and pharmaceutical importance of quinoa (Chenopodium quinoa)*. *Research journal of pharmacy and technology*, 14(3), 1779–1784. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2021.00316.4>
- Angeli, V., Silva, P., Crispim Massuela, D., Khan, M. W., Hamar, A., Khajehei, F., Graeff-Hönninger, S., & Piatti, C. (2020). *Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): An Overview of the Potentials of the “Golden Grain” and Socio-Economic and Environmental Aspects of Its Cultivation and Marketization*. *Foods*, 9(2), 216. <https://doi.org/10.3390/foods9020216>
- Bancel, E., Bonnot, T., Davanture, M., Alvarez, D., Zivy, M., Martre, P., Déjean, S., & Ravel, C. (2019). *Proteomic Data Integration Highlights Central Actors Involved in Einkorn (Triticum monococcum ssp. Monococcum) Grain Filling in Relation to Grain Storage Protein Composition*. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00832>
- Barba de la Rosa, A. P., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J., &

- Barba de la Rosa, A. P., Gueguen, Jacques., Paredes-Lopez, Octavio., & Viroben, Gerard. (1992). *Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(6), 931–936. <https://doi.org/10.1021/jf00018a002>
- Bedoya-Perales, N. S., Pumi, G., & Talamini, E. (2018). *The quinoa boom in Peru: Will land competition threaten sustainability in one of the cradles of agriculture? Land Use Policy: The International Journal Covering All Aspects of Land Use*, 79, 475–480.
- Birinyi, Z., Réder, D., Diós, Á., Korponay-Szabó, I. R., Hunyadi-Gulyás, É., Florides, C. G., Juhász, A., & Gell, G. (2022). *Immunoanalytic investigation of grain proteins antigenic for celiac disease patients in an einkorn collection*. Food Chemistry, 371, 131148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131148>
- Büyükköroğlu, G., Dora, D. D., Özdemir, F., & Hızal, C. (2018). *Chapter 15—Techniques for Protein Analysis. En D. Barh & V. Azevedo (Eds.), Omics Technologies and Bio-Engineering (pp. 317–351)*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00015-4>
- Carrillo Soto, J. G. (2012). *Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE)*. Universidad de Sonora. <http://repositorioinstitucional.uson.mx/handle/20.500.12984/2145>
- Castellón, M., Matiacevich, S., Buera, P., & Maldonado, S. (2010). *Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage*. Food Chemistry, 121(4), 952–958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.025>
- Chakavarti, B., & Chakavarti, D. (2008). *Electrophoretic separation of proteins*. Journal of Visualized Experiments: JoVE, 16, 758. <https://doi.org/10.3791/758>
- Christensen, S. A., Pratt, D. B., Pratt, C., Nelson, P. T., Stevens, M. R., Jellen, E. N. y Coleman, C. E. (2007). *Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) using microsatellite markers*. Plant Genetic Resources, 5(2), 82–95. <https://doi.org/10.1017/S1479262107672293>
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. Analytical Biochemistry, 151(2), 369–374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
- Council, N. R., Affairs, P. and G., Development, B. on S. and T. for I., & Innovation, A. H. P. of the A. C. on T. (1989). *Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. National Academies Press.
- Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2019). *Quinoa protein: Composition, structure and functional properties*. Food Chemistry, 299, 125161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125161>
- Daly, M., Bromilow, S. N., Nitride, C., Shewry, P. R., Gethings, L. A., & Mills, E. N. C. (2020). *Mapping Coeliac Toxic Motifs in the Prolamin Seed Storage*

- Proteins of Barley, Rye, and Oats Using a Curated Sequence Database*. *Frontiers in Nutrition*, 7, 87. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00087>
- Day, L., Cakebread, J. A., & Loveday, S. M. (2022). *Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties*. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 428–442. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.020>
- Donaire Tataje, G. V. (2018). *Caracterización molecular de 75 accesiones de quinua (Chenopodium quinoa Willd) del departamento de Puno mediante marcadores microsatélites*, Universidad Nacional Agraria La Molina. [oai:repositorio.lamolina.edu.pe:20.500.12996/3520](https://oai.repositorio.lamolina.edu.pe:20.500.12996/3520). <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3013554>
- Drastíková, E., Konderlová, K., Šebestová, A., Baron, D., Švecová, P., Tábořská, P., Vítková, K., Pospíšilová, V., Forostyak, S., Kořístek, Z., Porubová, L., & Petr, J. (2021). *Determination of total protein content in biomedical products by the PDMS-assisted lab-in-a-syringe assay using 3D printed scaffolds removal*. *Journal of Analytical Science and Technology*, 12(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00307-0>
- Eggenreich, B., Scholz, E., Wurm, D. J., Forster, F., & Spadiut, O. (2018). *The production of a recombinant tandem single chain fragment variable capable of binding prolamins triggering celiac disease*. *BMC Biotechnology*, 18(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0443-0>
- Fan, X., Guo, H., Teng, C., Zhang, B., Blecker, C., & Ren, G. (2022). *Anti-Colon Cancer Activity of Novel Peptides Isolated from In Vitro Digestion of Quinoa Protein in Caco-2 Cells*. *Foods*, 11(2), 194. <https://doi.org/10.3390/foods11020194>
- FAO. (2011). *Dietary protein quality evaluation in human nutrition* (92; p. 78). FAO. <https://www.fao.org/nutrition/requirements/es/>
- FAO. (2013). *Quinoa*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/quinoa/es/>
- FAO, W. (2007). *Codex alimentarius*. https://cir.nii.ac.jp/all?q=http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf
- Fernando, P., Hugo, I., Sergio, B. L., & Amy, M. (2016). *Hupa, Quinoa: Semilla sagrada, sustento ancestral*; Programa Conjunto Granos Andinos—UNESCO Digital Library (PE/2016/CL/1, p. 83). Unesco. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000261004>
- Filho, A. M. M., Pirozi, M. R., Borges, J. T. D. S., Pinheiro Sant'Ana, H. M., Chaves, J. B. P., & Coimbra, J. S. D. R. (2017). *Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1618–1630. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811>
- Fuentes, F., & Paredes-Gonzalez, X. (2014). *Perspectivas Nutracéuticas de la Quínoa: Propiedades Biológicas y aplicaciones funcionales* (pp. 341–357).
- García-Parra, M. Á., Plazas-Leguizamón, N. Z., Rodríguez, D. C. C., Torrado, S. C. F., & Parra, J. D. (2018). *Descripción de las saponinas en quinua (Chenopodium quinoa Willd) en relación con el suelo y el clima: Una*

- revisión. Informador Técnico, 82(2), Article 2.
<https://doi.org/10.23850/22565035.1451>
- Gell, G., Kovács, K., Veres, G., Korponay-Szabó, I. R., & Juhász, A. (2017). *Characterization of globulin storage proteins of a low prolamín cereal species in relation to celiac disease*. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/srep39876>
- Gómez Pando, L., & Aguilar Castellanos, E. (2016). *Guía de cultivo de la quínoa* | FAO. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*. <https://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/411552/>
- Hao, Y., Hong, Y., Guo, H., Qin, P., Huang, A., Yang, X., & Ren, G. (2022). *Transcriptomic and metabolomic landscape of quinoa during seed germination*. *BMC Plant Biology*, 22(1), 237.
<https://doi.org/10.1186/s12870-022-03621-w>
- Hinojosa, L., González, J. A., Barrios-Masias, F. H., Fuentes, F., & Murphy, K. M. (2018a). *Quinoa Abiotic Stress Responses: A Review*. *Plants*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/plants7040106>
- Hinojosa, L., González, J. A., Barrios-Masias, F. H., Fuentes, F., & Murphy, K. M. (2018b). *Quinoa Abiotic Stress Responses: A Review*. *Plants*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/plants7040106>
- Hussain, M. I., Farooq, M., Syed, Q. A., Ishaq, A., Al-Ghamdi, A. A., & Hatamleh, A. A. (2021). *Botany, Nutritional Value, Phytochemical Composition and Biological Activities of Quinoa*. *Plants*, 10(11), 2258.
<https://doi.org/10.3390/plants10112258>
- Itpgrfa, G. O. T. (2017). *Chenopodium quinoa* Willd CHEN-385. King Abdullah University of Science and Technology. <https://doi.org/10.18730/5m8ze>
- Jaikishun, S., Li, W., Yang, Z., & Song, S. (2019). *Quinoa: In Perspective of Global Challenges*. *Agronomy*, 9(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/agronomy9040176>
- Jarvis, D. E., Ho, Y. S., Lightfoot, D. J., Schmöckel, S. M., Li, B., Borm, T. J. A., Ohyanagi, H., Mineta, K. y Michell, C. T. (2017). *The genome of Chenopodium quinoa*. *Nature*, 542(7641), Article 7641.
<https://doi.org/10.1038/nature21370>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). *Bradford Assay for Determining Protein Concentration*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), 102269.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- Kozioł, M. J. (1992). *Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(1), 35–68. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(92\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0889-1575(92)90006-6)
- Kurien, B. T., Aggarwal, R., & Scofield, R. H. (2019). *Protein Extraction from Gels: A Brief Review*. En B. T. Kurien & R. H. Scofield (Eds.), *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols* (pp. 479–482). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_40
- Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature*, 227(5259), Article 5259.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lee, P. Y., Saraygord-Afshari, N., & Low, T. Y. (2020). *The evolution of two-dimensional gel electrophoresis—From proteomics to emerging alternative applications*. *Journal of Chromatography A*, 1615, 460763. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460763>
- Li, G.-Q., Shao, J., Guo, C.-G., Dong, J.-Y., Fan, L.-Y., & Cao, C.-X. (2012). *A simple monolithic column electroelution for protein recovery from gel electrophoresis*. *Analytical Biochemistry*, 430(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.008>
- Mabry, T. J., Taylor, A., & Turner, B. L. (1963). *The betacyanins and their distribution*. *Phytochemistry*, 2(1), 61–64. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88016-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88016-4)
- Manaa, A., Goussi, R., Derbali, W., Cantamessa, S., Essemine, J., & Barbato, R. (2021). *Photosynthetic performance of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) after exposure to a gradual drought stress followed by a recovery period*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1862(5), 148383. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148383>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2015). *Variedades de quinua*. <https://www.midagri.gob.pe/portal/444-granos-andinos/9377-variedades-de-quinua>
- Ministerio de salud, & Plataforma única del gobierno. (2013, febrero 17). *Por su alto valor nutritivo especialistas recomiendan consumir quinua dos veces por semana*. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/34327-por-su-alto-valor-nutritivo-especialistas-recomiendan-consumir-quinua-dos-veces-por-semana>
- Minsa. (2013). Minsa impulsa consumo de quinua a base de novedosas recetas [Plataforma única del Estado Peruano]. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/34316-minsa-impulsa-consumo-de-quinua-a-base-de-novedosas-recetas>
- Molina-Mora, J. A., Chinchilla-Montero, D., Castro-Peña, C., & García, F. (2020). *Two-dimensional gel electrophoresis (2D-GE) image analysis based on CellProfiler: Pseudomonas aeruginosa AG1 as model*. *Medicine (United States)*, 99(49), E23373. Scopus. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023373>
- Moscoso-Mujica, G., Zavaleta, A., Mujica, Á., Santos, M., & Calixto, R. (2017). *Fraccionamiento y caracterización electroforética de las proteínas de la semilla de kañihua (Chenopodium pallidicaule Aellen)*. *Revista chilena de nutrición*, 44(2), 144–152. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182017000200005>
- Mujica Sánchez, A., Jacobsen, S. E., & Izquierdo, J. (2014). *American and european test of quinua (Chenopodium quinoa Willd.)* (p. 41). FAO. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=%5BField+book+%3A+a+american+and+european+test+of+quinua+%28Chenopodium+quinoa+Willd.%29%5D&author=Mujica+S%C3%A1nchez%2C+A.&publication_year=1998
- Naryzhny, S. (2016). *Towards the Full Realization of 2DE Power*. *Proteomes*, 4(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/proteomes4040033>

- Nasim, P., Heshmat, O., Hassanali, N. B., & Amir, B. (2021). *Botanical, phytochemical and pharmacological properties of quinoa medicinal plant (Chenopodium quinoa Willd.)*; A review. *Journal of Medicinal Herbs*, 12(4: 1-11), 11. <https://doi.org/doi:10.30495/MEDHERB.2021.687323>
- Nolasco, O., Cruz, W., Cruz, C. S., & Gutierrez, A. (2013). *Evaluación del polimorfismo de adn de seis variedades de Chenopodium quinoa Willd, utilizando aflp*. *The biologist*, 11(2), article 2. <https://doi.org/10.24039/rtb2013112405>
- O'Farrell, P. H. (1975). *High resolution two dimensional electrophoresis of proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007–4021. Scopus.
- Oliveira, B. M., Coorssen, J. R., & Martins-de-Souza, D. (2014). *2DE: The Phoenix of Proteomics*. *Journal of Proteomics*, 104, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.035>
- Paliwal, R., & Palakurthi, S. (2014). *Zein in controlled drug delivery and tissue engineering*. *Journal of Controlled Release*, 189, 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.036>
- Pathan, S., Ndunguru, G., & Ayele, A. G. (2024). *Comparison of the Nutritional Composition of Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) Inflorescences, Green Leaves, and Grains*. *Crops*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/crops4010006>
- Phillips, L. G. (2013). *Structure-Function Properties of Food Proteins*. Academic Press.
- Pycia, K., Gesinski, K., Jaworska, G., & Barczak, B. (2019). *Comparative analysis of selected physicochemical properties of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.), maize, wheat and potato starch*. *Journal of Central European Agriculture*, 20(2), 626–635. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/20.2.2134>
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., & Jacobsen, S. E. (2003). *Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (Chenopodium quinoa) and Kañiwa (Chenopodium pallidicaule)*. *Food Reviews International*. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018884>
- Risi, J. C., & Galwey, N. W. (1989). *The pattern of genetic diversity in the Andean grain crop quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)*. I. Associations between characteristics. *Euphytica*, 41(1), 147–162. <https://doi.org/10.1007/BF00022424>
- Rizzo, A. J., Palacios, M. B., Vale, E. M., Zelada, A. M., Silveira, V., & Burrieza, H. P. (2023). *Snapshot of four mature quinoa (Chenopodium quinoa) seeds: A shotgun proteomics analysis with emphasis on seed maturation, reserves and early germination*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 29(3), 319. <https://doi.org/10.1007/s12298-023-01295-8>
- Romero-Rodríguez, M. C., Maldonado-Alconada, A. M., Valledor, L., & Jorriño-Novo, J. V. (2014). *Back to Osborne. Sequential protein extraction and LC-MS analysis for the characterization of the Holm oak seed proteome*. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1072, 379–389. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3_27
- Scherf, K. A., Catassi, C., Chirido, F., Ciclitira, P. J., Feighery, C., Gianfrani, C., Koning, F. y Lundin, K. E. A. (2020). *Recent Progress and*

- Recommendations on Celiac Disease From the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity.* *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.00029>
- Scherf, K. A., Catassi, C., Chirido, F. G., Ciclitira, P. J., Feighery, C. F., Gianfrani, C. y Koning, F. (2021). *Statement of the Prolamin Working Group on the Determination of Gluten in Fermented Foods Containing Partially Hydrolyzed Gluten.* *Frontiers in Nutrition*, 7, 626712. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.626712>
- Simonian, M. H., & Smith, J. A. (2006). *Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration.* *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 10, Unit 10.1A. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1001as76>
- Sollid, L. M., Tye-Din, J. A., Qiao, S.-W., Anderson, R. P., Gianfrani, C., & Koning, F. (2020). *Update 2020: Nomenclature and listing of celiac disease–relevant gluten epitopes recognized by CD4+ T cells.* *Immunogenetics*, 72(1), 85–88. <https://doi.org/10.1007/s00251-019-01141-w>
- Song, J., Sun, C., Gul, K., Mata, A., & Fang, Y. (2021). *Prolamin-based complexes: Structure design and food-related applications.* *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1120–1149. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12713>
- Spehar, C. R., & Santos, R. L. de B. (2005). *Agronomic performance of quinoa selected in the Brazilian Savannah.* *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, 609–612. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000600012>
- Tapia-Hernández, J. A., Del-Toro-Sánchez, C. L., Cinco-Moroyoqui, F. J., Juárez-Onofre, J. E., Ruiz-Cruz, S., Carvajal-Millan, E., López-Ahumada, G. A. y Castro-Enriquez, D. D.(2019a). *Prolamins from cereal by-products: Classification, extraction, characterization and its applications in micro- and nanofabrication.* *Trends in Food Science & Technology*, 90, 111–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.005>
- Tapia-Hernández, J. A., Del-Toro-Sánchez, C. L., Cinco-Moroyoqui, F. J., Juárez-Onofre, J. E., Ruiz-Cruz, S., Carvajal-Millan y E., López-Ahumada. (2019b). *Prolamins from cereal by-products: Classification, extraction, characterization and its applications in micro- and nanofabrication.* *Trends in Food Science & Technology*, 90, 111–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.005>
- Tavano, O. L., Amistá, M. J. de M., Del Ciello, G., Rodrigues, M. C. M., Bono Nishida, A. M. y Valadares, L. A (2022). *Isolation and evaluation of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) protein fractions. A nutritional and bio-functional approach to the globulin fraction.* *Current Research in Food Science*, 5, 1028–1037. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.06.006>
- The Vegetable Proteins.* (1924). *Nature*, 114(2875), Article 2875. <https://doi.org/10.1038/114822c0>
- Udaka, J., Koga, T., Tsuji, H., Kimoto, M., & Takumi, K. (2000a). *Efficient extraction and some properties of storage proteins (prolamin and glutelin) in ancient rice cultivars.* *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 46(2), 84–90. <https://doi.org/10.3177/jnsv.46.84>

- Udaka, J., Koga, T., Tsuji, H., Kimoto, M., & Takumi, K. (2000b). *Efficient extraction and some properties of storage proteins (prolamin and glutelin) in ancient rice cultivars*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 46(2), 84–90. <https://doi.org/10.3177/jnsv.46.84>
- Van de Vondel, J., Lambrecht, M. A., & Delcour, J. A. (2020). *Osborne extractability and chromatographic separation of protein from quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) wholemeal*. *LWT*, 126, 109321. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109321>
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. A. (2010). *Nutrition facts and functional potential of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.), an ancient Andean grain: A review*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2541–2547. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4158>
- WGPAT. (2011). *PWG-Gliadin*. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. <https://www.wgpat.com/pwggliadin.html>
- Xing, J., Li, Z., Zhang, W., & Wang, P. (2023). *The Composition, Structure, and Functionalities of Prolamins from Highland Barley*. *Molecules*, 28(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/molecules28145334>
- Zhan, X., Yang, H., Peng, F., Li, J., Mu, Y., Long, Y., Cheng, T. y Huang, Y (2018). *How many proteins can be identified in a 2DE gel spot within an analysis of a complex human cancer tissue proteome*. *Electrophoresis*, 39(7), 965–980. <https://doi.org/10.1002/elps.201700330>
- Zheng, D., & Zhang, Q.-F. (2019). *Bioavailability Enhancement of Astilbin in Rats through Zein-Caseinate Nanoparticles*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(20), 5746–5753. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00018>
- Zurita-Silva, A., Fuentes, F., Zamora, P., Jacobsen, S.-E., & Schwember, A. R. (2014). *Breeding quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): Potential and perspectives*. *Molecular Breeding*, 34(1), 13–30. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0023-5>

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd, Ayacucho 2024.

CONSTANCIA

**LA BIOLOGA LAURA AUCASIME MEDINA ESPECIALISTA EN
TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DE PLANTAS DEJA CONSTANCIA:**

Que, el Bachiller. en Ciencias Biológicas, **Sr. Marco Antonio, BORDA LIZARBE**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. siendo su taxonomía el siguiente:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	:	CARYOPHYLLALES
FAMILIA	:	CHENOPODIACEAE
GENERO	:	Chenopodium
ESPECIE	:	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
N.V.	:	"quinua"
VARIEDADES	:	Amarilla, Blanca, Negra y Roja

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 24 de Mayo del 2024


LAURA AUCASIME MEDINA
BIÓLOGA
Reg. C.B.P. N° 583 C.R. - XIII

Anexo 2. Preparación de soluciones para la fragmentación de proteínas (método modificado de Osborne).

A. Preparación de reactivo para extracción de albúminas.

COMPONENTE	CANTIDAD
NaCl	10 g
pH	3

Mezclar el NaCl en 10 mL de H₂O_(d) desionizada y auto clavada, enrazar a 100 mL.

B. Preparación de reactivo para extracción de globulinas 7s.

COMPONENTE	CANTIDAD
Na ₂ HPO ₄	0,142 g
EDTA	0,036 g
NaCl	0,568 g
pH	7,5

Mezclar los reactivos en 10 mL de H₂O_(d) desionizada y auto clavada, enrazar a 100 mL.

C. Preparación de reactivo para extracción de globulinas 11s.

COMPONENTE	CANTIDAD
Na ₂ HPO ₄	0,142 g
EDTA	0,036 g
NaCl	4,67 g
pH	7,5

Mezclar los reactivos en 10 mL de H₂O_(d) desionizada y auto clavada, enrazar a 100 mL.

D. Preparación de reactivo para extracción de prolaminas.

COMPONENTE	CANTIDAD
2-propanol	35 mL

Mezclar el 2-propanol en 10 mL de H₂O_(d) desionizada y auto clavada, enrazar a 50 mL.

Anexo 3. Preparación de soluciones de trabajo para preparar gel SDS-PAGE (método de Laemmli).

A. Solución de trabajo acrilamida/bis acrilamida al 40 %

Componentes	Cantidad	Concentración final
Acrilamida	38,9 g	38,9 %
Bis acrilamida	1,1 g	1,1 %

Disolver con H₂O_(d) 100 mL y conservar

B. SDS al 10 %

Disolver 10 g de SDS en 80 mL de agua bidestilada, llevar a pH 7,2 con 10 N de NaOH, finalmente se completa a 100 mL con la misma agua.

C. PERSULFATO DE AMONIO AL 10 % (APS)

Pesar 100 mg y diluir en un volumen final 1mL con agua tridestilada.

D. TEMED

Dispensar 1,5 mL en un tubo Eppendorf del envase original, cubrir con papel aluminio, mantener refrigerado y fuera del alcance de la luz.

E. BUFFER TRIS 1,5 M a pH 8,8

Pesar 181,65 g de tris base (Tris (hidroximetil aminometano)) y enrasar con agua bidestilada hasta 1L, ajustar el pH a 8,8 con HCl_C.

F. BUFFER TRIS 0,5 M a pH 6,8

Pesar 60,55 g de tris base (Tris (hidroximetil aminometano)) y enrasar con agua bidestilada hasta 1L, ajustar el pH a 6,8 con HCl_C.

Anexo 4. Preparaciones de geles SDS-PAGE (método de Laemmli).

A. Gel separador al 15 %

Componentes	Volumen de la solución
Gel al 15 %	5 mL (1 cámara)
H ₂ O _{bd}	1,1 mL
Acrilamida/bisacrilamida 40 %	2,5 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	1,3 mL
SDS 10 %	50 µL
Persulfato de amonio 10 %	25 µL
TEMED	5 µL

B. Gel concentrador al 5 %

Componentes	Volumen de la solución
Gel al 5 %	1,8 mL (1 cámara)
H ₂ O _{bd}	0,98 mL
Acrilamida/bisacrilamida 40 %	0,38 mL
Tris 0,5 M pH 6,8	0,34 mL
SDS 10 %	50 µL
Persulfato de amonio 10 %	25 µL
TEMED	3 µL

Anexo 5. Preparación de soluciones para corrida electroforética de gel SDS-PAGE (método de Laemmli).

A. Buffer de electroforesis tris-glicina 10x para proteínas

Reactivos	10x	Concentración final
STris base	7,6 g	0,25 M
Glicina	37,5 g	2M
SDS	2,5 g	1 %

Preparar en un vaso precipitado con 100 mL de agua bidestilada y enrazar hasta 250 mL, ajustar a pH 8,3 con HCl concentrado.

B. Preparación de tampón de carga 4x

Componentes	10 mL	Concentración final
Tris 0,5 M pH 6,8	2,5 mL	0,125 M
SDS al 10 %	2,5 mL	2,5 %
2-Mercaptoetanol	2,5 mL	25 %
Glicerol	2,5 mL	25 %
Azul de bromofenol	1 mg	0,1 mg/mL

Mantener refrigerado mínimamente a 4° C.

Anexo 6. Preparación de soluciones para la coloración y decoloración de gel SDS-PAGE (método modificado de Laemmli).

A. Solución colorante azul brillante de Coomassie mixta

Componentes	200 mL
Azul brillante de Coomassie G-250	0,1 g
Azul brillante de Coomassie R-250	0,1 g
Sulfato de cobre	0,3 g
Metanol	60 mL
Ácido acético glacial	20 mL
Agua bidestilada	120 mL

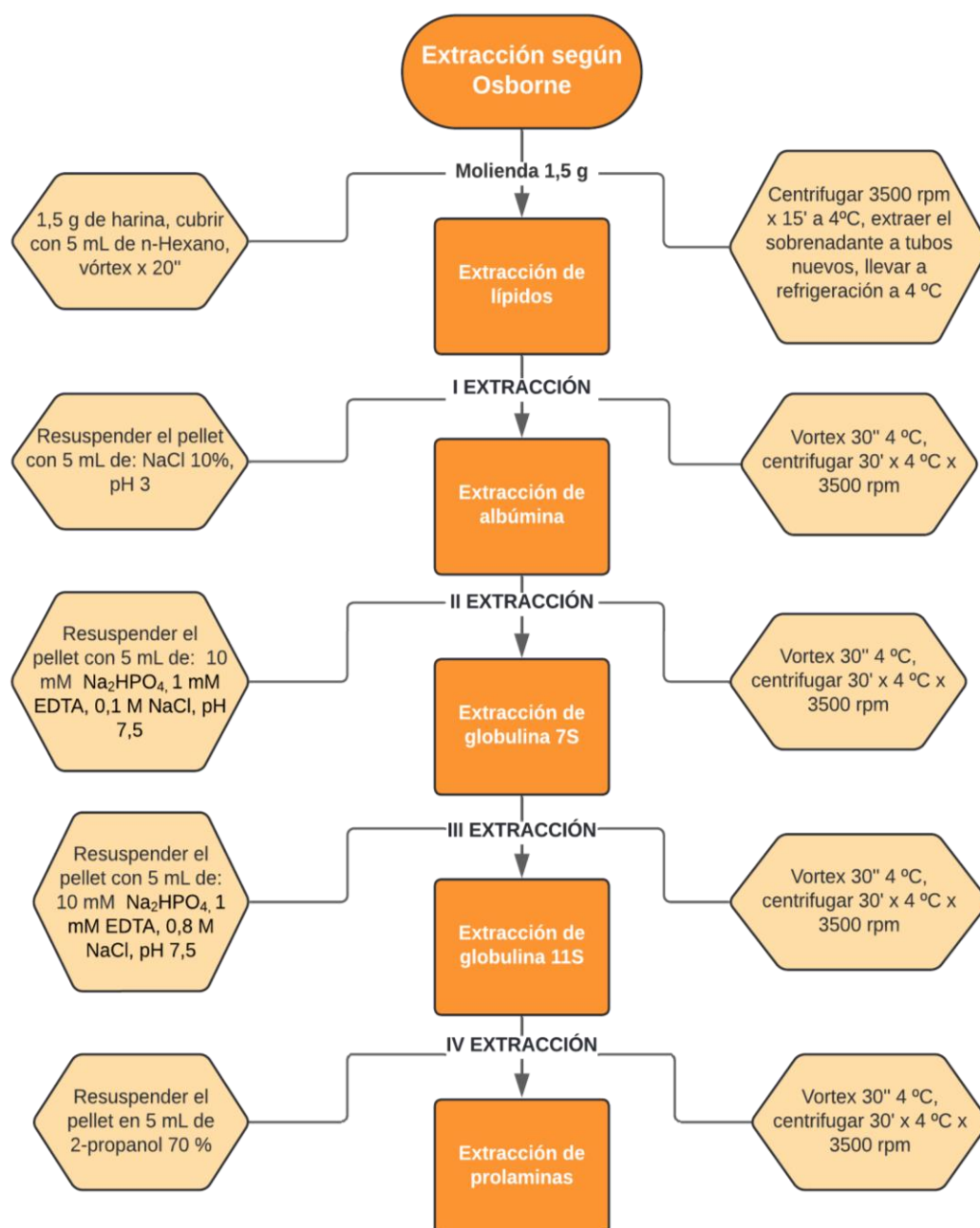
Filtrar la solución final en papel Whatman N°1 y disponer en envase color ámbar, conservar en refrigeración.

B. Solución decolorante

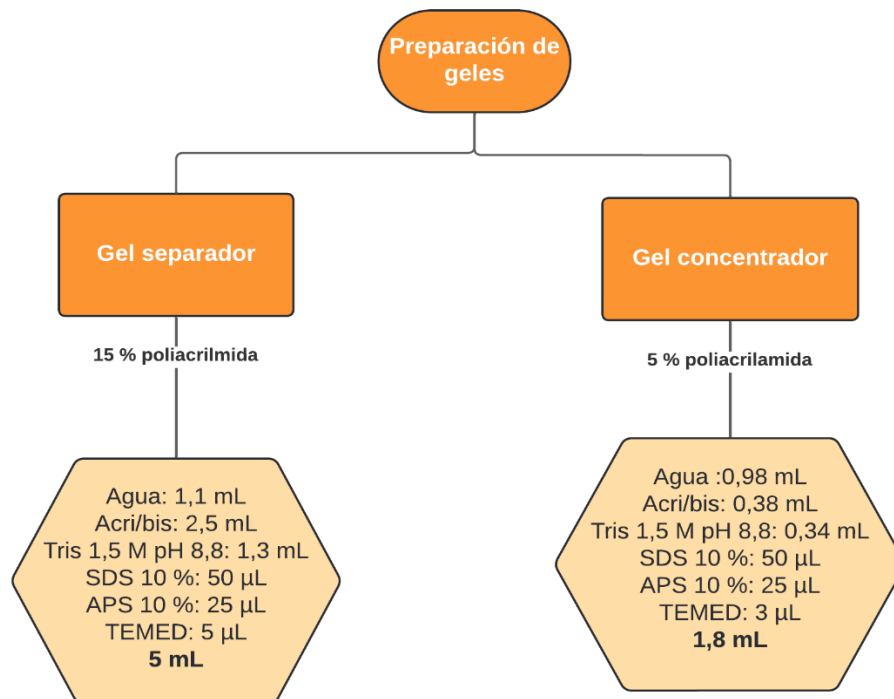
Componentes	250 mL
Metanol 95 %	25 mL
Ácido acético glacial	12,5 mL
Agua bidestilada	212,5 mL

Disponer en envase color ámbar, conservar en refrigeración.

Anexo 7. Flujograma de proceso de extracción de fracciones proteicas según metodología modificada de Osborne.



Anexo 8. Flujograma para la preparación de geles para cámara pequeña de 1,5 mm.



Anexo 9. Vista panorámica del centro poblado de San Miguel de Motoy y Motoy alto – distrito de Chiara, Ayacucho 2024.



Anexo 10. Recolección de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” en el distrito de Chiara, Ayacucho 2024.





Anexo 11. Vista panorámica de los centros de agricultura de Seccelambras, Chontaca y Acocro respectivamente del distrito de Acocro, Ayacucho 2024.



Anexo 12. Recolección de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” en el distrito de Acocro, Ayacucho 2024.



Anexo 13. Vista panorámica del distrito de Vilcas Huamán – Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.



Anexo 14. Recolección de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” en el distrito de Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.



Anexo 15. Muestras libres de impurezas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” provenientes de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.



Muestras de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” proveniente del distrito de Acocro

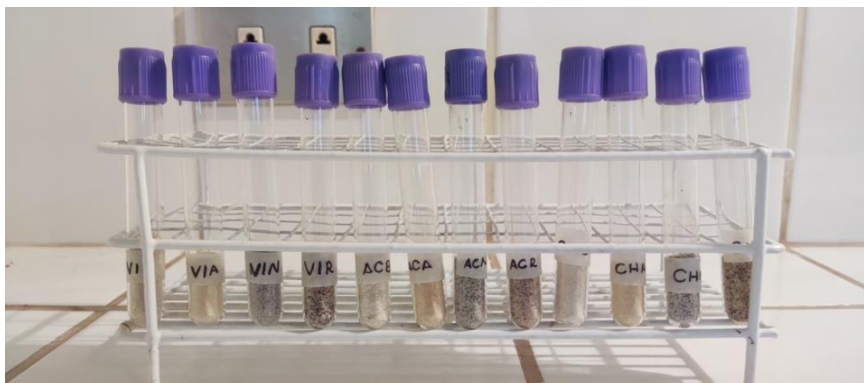


Muestras de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” proveniente del distrito de Vilcas Huamán



Muestras de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” proveniente del distrito de Chiara

Anexo 16. Proceso de deslipidización con N-hexano de 4 accesiones *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” provenientes de los distritos de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.



Muestras molidas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”



Tesista en proceso de extracción de lípidos con N-hexano en muestras molidas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”



Muestras molidas con N-hexano de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”

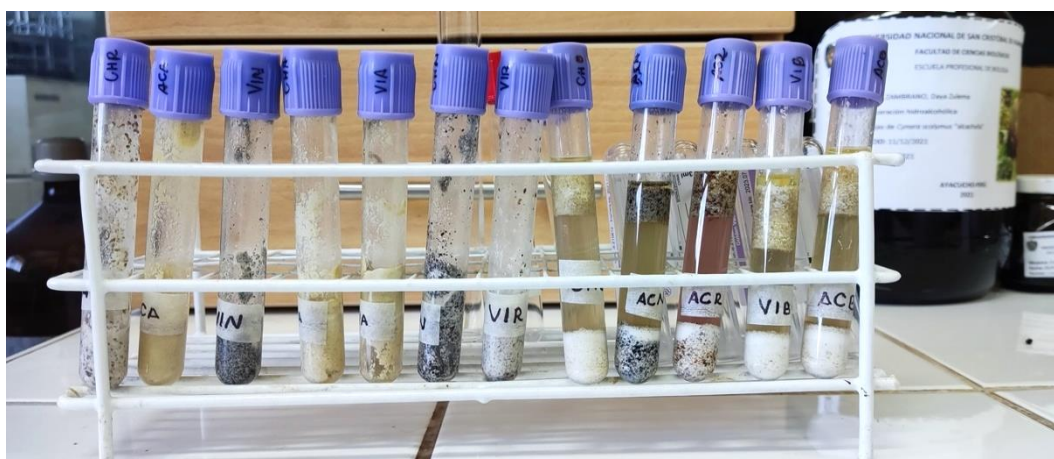


Muestras molidas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" después de 24 horas de agitación constante a 100 rpm.

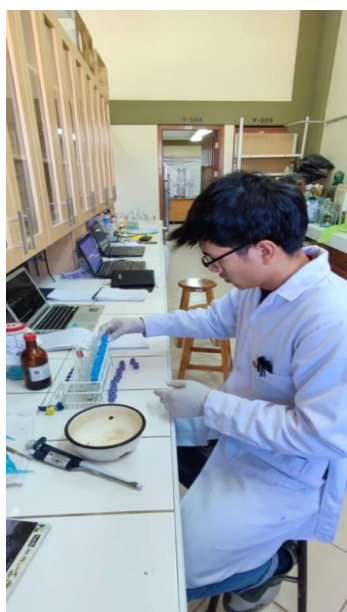


Muestras molidas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" centrifugadas y en reposo por 24 horas para la total eliminación de N-hexano por evaporación.

Anexo 17. Proceso de extracción de proteínas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” provenientes de los distritos de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.



Anexo 18. Proceso de extracción de prolaminas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd provenientes de los distritos de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán, Ayacucho 2024.



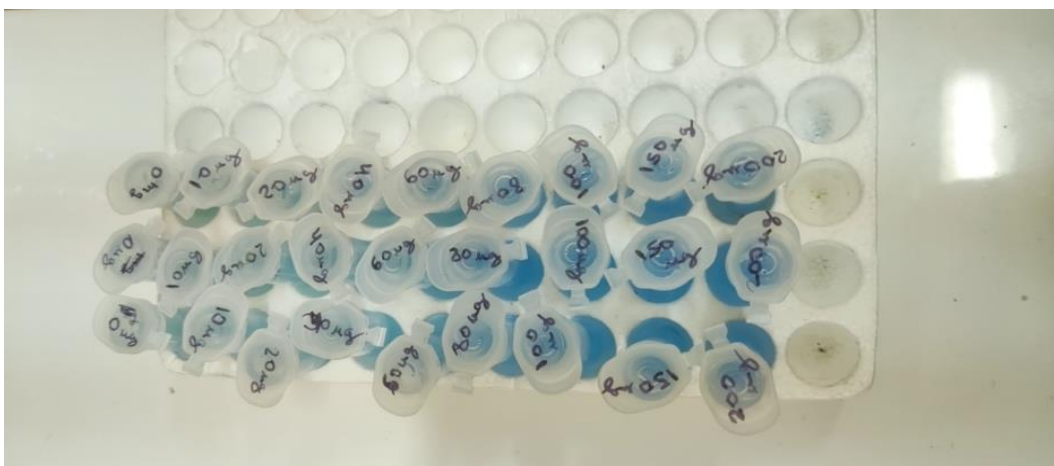


Aislados de prolaminas de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” provenientes de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán

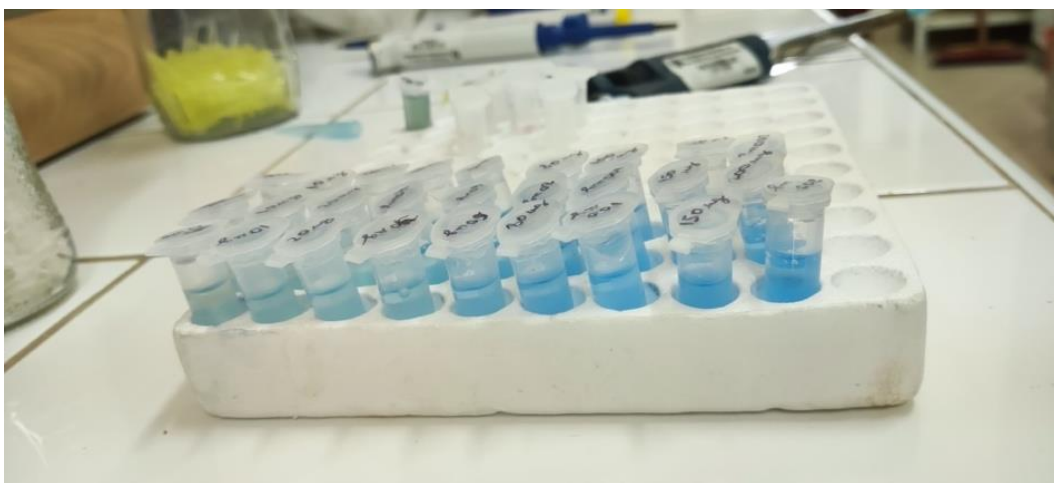
Anexo 19. Preparación de estándares de BSA al 10 % para la curva de calibración mediante la técnica de Bradford.



Tesista añadiendo la solución de Bradford a diferentes concentraciones de BSA al 10 %.

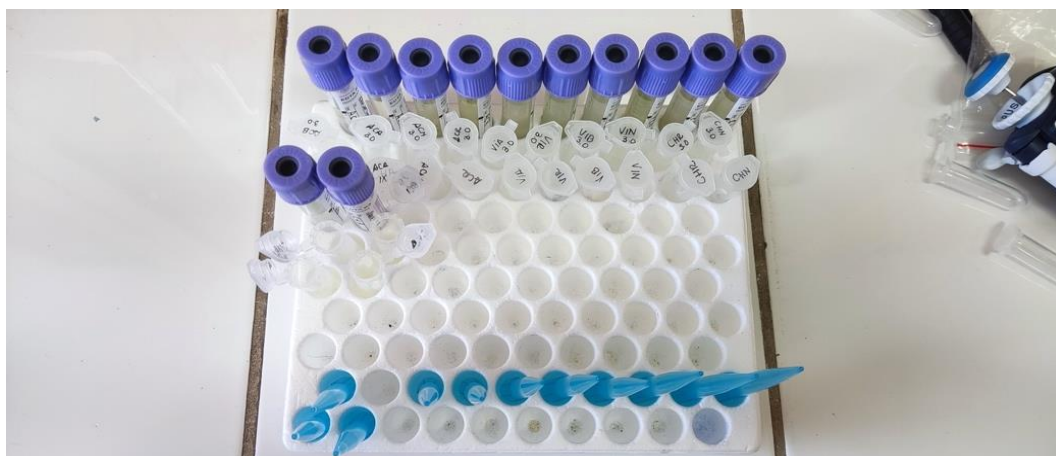
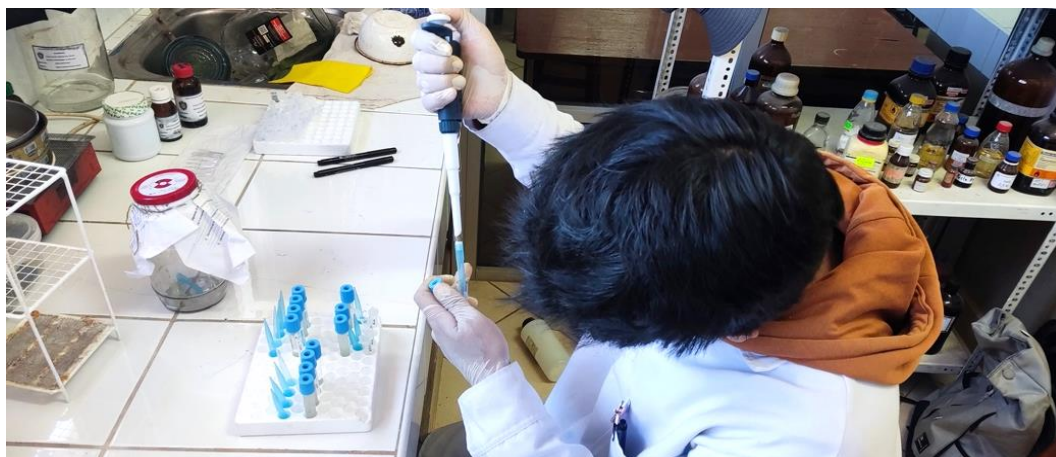


Estándares de BSA al 10 % desde 0,001 µg/µL hasta 0,15 µg/µL con reacción de Bradford.



Escala de colorimetría a causa de la reacción de Bradford a diferentes concentraciones de BSA al 10 %.

Anexo 20. Tesista resuspendiendo concentrado de proteínas de prolamina en 1000 μ L de H₂O bidestilada, desionizada y autoclavada de 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”.



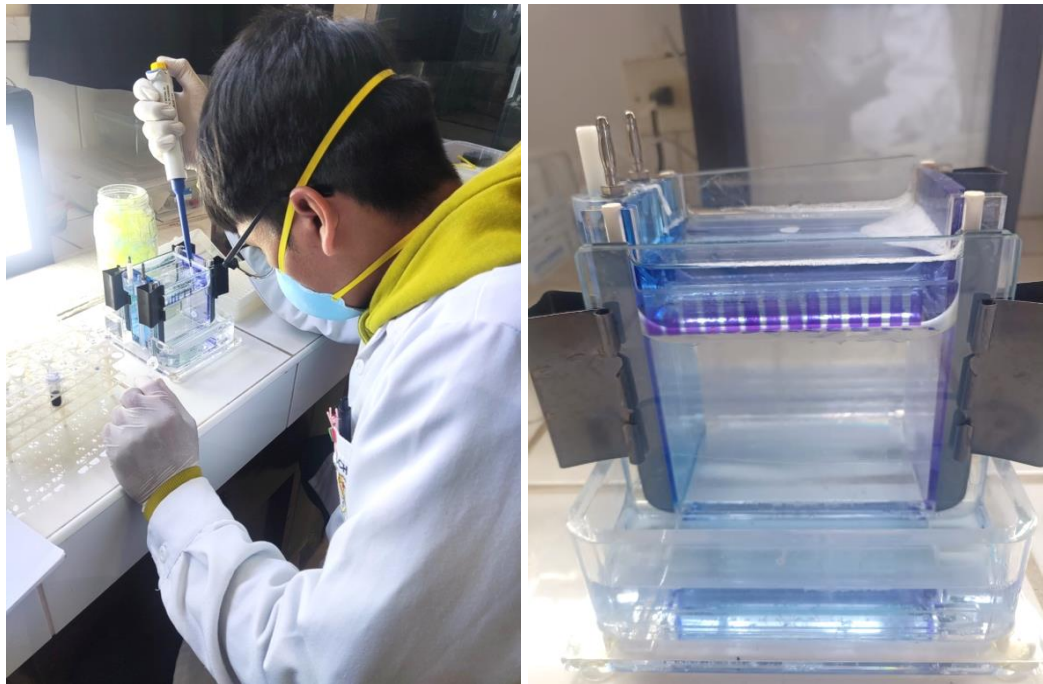
Anexo 21. Corrida de electroforesis SDS-PAGE de las 4 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” provenientes de los distritos de Chiara, Acocro y Vilcas Huamán.



Equipos de electroforesis; fuente de poder, electrodos, cámara de corrida y transiluminador



Armado de matrices de gel SDS-PAGE al 15 % (separador) y 5 % (concentrador).



Sembrado de muestras proteicas + buffer de siembra 4x en gel SDS-PAGE



Observación de bandas en matriz SDS-PAGE en el transiluminador.

Anexo 22. Matriz de consistencia.

Título: Contenido de prolaminas en cuatro accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”, Ayacucho 2023.

Autor: Bach. Marco Antonio Borda Lizarbe

Asesor: Dra. Roberta Brita Anaya González,

Mg. Reynán Cóndor Alarcón

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables e indicadores	Metodología
¿Será diferente el contenido de prolaminas en cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> ; Willd “quinua”?	Objetivo general Evaluar la variabilidad del contenido de prolaminas en cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. Objetivos específicos 1. Cuantificar prolaminas en cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. 2. Determinar el perfil electroforético 2D mediante su densitometría de los aislados de prolaminas en cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. 3. Comparar el contenido de prolaminas entre las cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. 4. Analizar la correlación entre los perfiles de prolaminas de las diferentes accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”.	Ho: El contenido de prolaminas en cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i>; Willd “quinua” no son diferentes. Ha: El contenido de prolaminas en cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i>; Willd “quinua” son diferentes.	Variable principal Cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. Indicador Cuatro accesiones de quinua (blanca, amarilla, roja y negra) Variable secundaria Contenido de prolaminas en cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua”. Indicador • Concentración de prolamina en mg% • Estimación de peso molecular de las prolaminas Indicador Perfil de prolamina: kDa	Tipo de investigación Básica Nivel de investigación Descriptiva Método Descriptivo Diseño Población Semillas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” del distrito de Vilcas Huamán, Chiara y Acocro Muestra Un Kg de semillas de cuatro accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” (blanca, roja, negra y amarilla). Muestreo Por conveniencia Unidad de análisis 1.5 g de harina de semillas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd “quinua” dulce y amarga. Métodos instrumentales Análisis por método de Osborne modificado y electroforesis 1D.

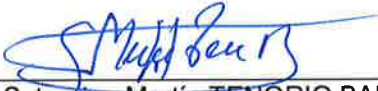
**UNSCH**FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

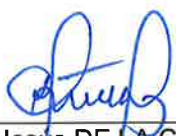
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Marco Antonio BORDA LIZARBE
RESOLUCIÓN DECANAL N° 483-2024-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las nueve de la mañana del día viernes veintidos de noviembre del año dos mil veinticuatro; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente el Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista, Dr. Jesús De La Cruz Arango (miembro – jurado), el Dr. Gilmar Peña Rojas (miembro – jurado), Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich (miembro – jurado), Dra. Roberta Brita Anaya González (miembro – asesora) actuando como secretaria docente encargada la Blga. Rosana Luzia Ventura Caveró con memorando N° 358-2024-UNSCH(IN)-FCB de fecha diecinueve de noviembre de dos mil veinticuatro, para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Contenido de prolaminas en cuatro accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”**. Presentado por el Bach. **Marco Antonio BORDA LIZARBE**, el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó a la secretaria docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas al sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Jesús DE LA CRUZ ARANGO	17	17	17
Dr. Gilmar PEÑA ROJAS	15	14	15
Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH	19	19	19
		PROMEDIO	17

El sustentante alcanzó el promedio de 17 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso del sustentante y el público al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las once con veinte minutos de la mañana; firmando al pie del presente en señal de conformidad.


Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA
Presidente


Dr. Jesús DE LA CRUZ ARANGO
Miembro – jurado


Dr. Gilmar PEÑA ROJAS
Miembro – jurado


Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH
Miembro – jurado


Dr. Roberta Brita ANAYA GONZÁLEZ
Miembro – asesora


Blga. Rosana Luzia VENTURA CAVERO
Secretaria docente (e)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 93-2024-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Contenido de prolaminas en cuatro accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua"**, por MARCO ANTONIO BORDA LIZARBE; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 10%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCU-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 11 de diciembre de 2024.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela Profesional de Biología
Dr. Fidel R. Mujica Lengua
DIRECTOR

Contenido de prolaminas en cuatro accesiones de Chenopodium quinoa Willd “quinua”

por MARCO ANTONIO BORDA LIZARBE

Fecha de entrega: 11-dic-2024 02:45p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2549363365

Nombre del archivo: BORDA_LIZARBE-_Marco_Antonio-pregrado-2024_TURNITIN.pdf (858.24K)

Total de palabras: 10025

Total de caracteres: 51039

Contenido de prolaminas en cuatro accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua”

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

9%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	3%
2	repositorio.uaaan.mx:8080 Fuente de Internet	1%
3	docplayer.es Fuente de Internet	1%
4	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	repositorio.unheval.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1%

9

dspace.unl.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

10

Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y
de Estudios Superiores de Monterrey

Trabajo del estudiante

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo