

OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN Y LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN SEMILLAS GERMINADAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

AN EFFICIENT EXTRACTION AND QUANTIFICATION METHOD TO TOTAL PROTEIN ANALYSIS FROM CORN (*Zea mays* L.) GERMINATED SEEDS

Yaned Milena CORREA NAVARRO^{1,2*}, Laura María BURITICÁ SALAZAR¹, Juan David RIVERA GIRALDO^{1,2}, Juan Pablo PENAGOS GONZÁLEZ², Javier Ignacio TORRES OSORIO¹

¹ Grupo de Campos Electromagnéticos. Medio Ambiente y Salud Pública. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas.

² Grupo de Investigación en Cromatografía y Técnicas Afines (GICTA). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas.

*Autor Corresponsal. E-mail: yaned.correa@ucaldas.edu.co

Historia del Artículo

Recibido: Agosto 19, 2016

Evaluado: Enero 05, 2016

Aceptado: Enero 15, 2017

Disponible: Febrero 07, 2017

Resumen

El maíz (*Zea mays* L.) es el cereal de mayor cultivo a nivel mundial, del cual se pueden obtener para consumo humano, harina, fibra, aceite y proteínas; de estas últimas se han aislado diferentes tipos tales como albúminas, globulinas, prolaminas y gluteninas; sin embargo, dada la variedad de estas biomoléculas, su obtención no ha sido fácil. Este trabajo se realizó para determinar el mejor método para la extracción y la cuantificación de las proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.), para lo cual se compararon seis protocolos de extracción que resultaron al combinar dos métodos físicos convencionales: agitación orbital o asistida con ultrasonido, y tres solventes de extracción: ácido tricloroacético, Tris-Base y Tris-HCl. Previamente se eligió el mejor método de cuantificación por espectroscopía de ultravioleta visible empleando los reactivos cromogénicos de: Lowry, Bio-Rad y Bradford. Los mejores resultados (10,83 mg/l de proteína) se obtuvieron con la extracción asistida con ultrasonido en combinación con Tris-Base y empleando el reactivo de Bradford para la generación del color y la posterior cuantificación por espectroscopía de ultravioleta-visible.

Palabras Clave: Evaluación de proteínas totales, análisis de biomoléculas, método espectrofotométrico, lixiviación, Bradford.

Abstract

Corn (*Zea mays* L.) is a major cereal grain throughout the world, from corn, people can obtain some products such as starch, fiber, oil, and protein. In corn, different types of proteins are found: albumins, globulins, prolamins and glutenins; however, diverse characteristics of this biomolecules difficult extraction process. In the present study, corn (*Zea mays* L.) seeds proteins were extracted by six different protocols. For this, orbital agitation and ultrasound-assisted extraction combined with Tris-Base, Tris-HCl and trichloroacetic acid like extracting solvents were used. Previously, the chromogenic reagents of Lowry, Bio-Rad and Bradford were evaluated to identify the best spectrophotometric total proteins quantification method. The best combination was ultrasound-assisted extraction with Tris-Base (10,83 mg/l total protein) measured by Bradford spectrophotometric method.

Keywords: Total protein evaluation, biomolecules analysis, spectrophotometric method, lixiviation, Bradford.

INTRODUCCIÓN

Los cereales son las plantas más estudiadas por su importancia agroeconómica; estos pertenecen a tres familias: Ehrhartoideae (arroz), Pooideae (avena, trigo y cebada) y Panicoideae (maíz, sorgo y mijos) (Kellogg, 2001).

El maíz es la planta más domesticada y evolucionada del reino vegetal (Asturias, 2004), es un pasto gigante de origen tropical mexicano, usado para producir granos y forraje, los cuales constituyen la base para la elaboración de un buen número de alimentos tanto para el ser humano como para los animales de cría, así como variedad de productos para las

industrias farmacéutica y manufacturera. De los 1.1 millones de toneladas de cereales secundarios producidos en el mundo durante el año 2010, el 74% fue maíz (FAO, 2010). En Colombia es el cultivo con la segunda mayor extensión, se encuentra ampliamente difundido en todas las regiones naturales del país, debido a su adaptación especial a diversas condiciones agroclimáticas y socioeconómicas, cultivándose desde la Guajira hasta el Amazonas y desde la Costa Pacífica hasta los Llanos Orientales; desde el nivel del mar hasta los 3000 m.s.n.m, en situaciones contrastantes y con precipitaciones desde 300 mm al año en la Guajira, hasta 10000 mm en el Chocó. (FENALCE, 2010).

La semilla de maíz está constituida por dos partes principales, el germen y el endospermo. El primero (11% de la masa seca) contiene la mayor cantidad de aceite de la semilla y proteínas hidrosolubles; mientras que el segundo (83% de la masa seca) está compuesto principalmente por almidón y proteínas liposolubles (Aspelund y Glatz, 2010). Estas últimas son una mezcla compleja que incluye fracciones de albúminas, globulinas, zeínas o prolaminas y gluteninas (Wegary et al. 2011). Las proteínas de almacenamiento de las semillas de maíz, han sido investigadas ampliamente en cuatro áreas principales: 1) análisis de la diversidad genética dentro y entre las especies, 2) la domesticación de la planta en relación con la conservación de los recursos genéticos y la descendencia, 3) estudios desde la perspectiva genómica y 4) como una herramienta en la mejora de los cultivos (Ghafoor et al. 2002). Sin embargo, las técnicas de extracción de proteínas siguen siendo un desafío para el análisis preciso de estas moléculas, razón por la cual son diversos los protocolos disponibles en la literatura (Ranjan et al. 2012). Asimismo, existen muchos métodos para la determinación de proteínas, algunos de los cuales se valen de la absorción que presentan estas moléculas al ser coloreadas con reactivos específicos; cada uno de estos procedimientos tiene su particularidad, y el mejor solo podrá ser determinado dependiendo de las concentraciones de las proteínas en las muestras (García y Vásquez, 1998). El objetivo de este trabajo, fue comparar y determinar el mejor método para la extracción y la cuantificación de las proteínas totales de semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS |

Materiales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron Sharlau grado analítico, y las semillas de maíz (*Zea mays* L.) empleadas fueron variedad Amarillo ICA V-305 tipo comercial de tamaño grande, producidas por Semillas del Pacífico. Se seleccionaron semillas sin daños visibles y con morfología uniforme.

Germinación de las semillas de maíz

Las semillas de maíz previamente seleccionadas se sembraron en cajas Petri (100 x 15) mm, con papel

absorbente como soporte. A cada caja se le adicionaron 12.0 mL de agua destilada y se colocaron en una incubadora Incucell de 222 L sin luz, a una temperatura de $30.1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$. La humedad del sistema fue de $59.00\% \pm 3.39\%$. Después de 48 horas, las semillas se sacaron de la incubadora, se les retiró la radícula y fueron trituradas con ayuda de un molino eléctrico hasta obtener un polvillo muy fino que se guardó en una bolsa de sello hermético y en nevera a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior extracción.

Extracción de proteínas

Las proteínas totales fueron extraídas mediante el uso de tres solventes diferentes: solvente A, TCA: ácido tricloroacético 10% (Natarajan et al. 2005); solvente B, Tris-HCl: Tris-HCl 0,05 M; urea 5 M; SDS (Dodecil-sulfato sódico) 0,02% y glicerol 1% (Ranjan et al. 2012); solvente C, Tris-Base: Tris-Base 0,05 M; ácido cítrico monohidratado 0,007 M; hidrócloruro de cisteína 0,1%; ácido ascórbico 0,1% y glicerol 1% (Ranjan et al. 2012), y dos métodos extractivos diferentes, como se presenta a continuación.

Método A: Agitación orbital

500 mg del polvo de la semilla se depositaron en un tubo de ensayo con 3 mL del solvente de extracción (TCA (A), Tris-HCl (B) o Tris-Base (C)) y se colocaron en un agitador orbital durante una hora. Al cabo de este tiempo el material se decantó obteniéndose un sobrenadante y un pellet; el primero se retiró y se conservó, mientras que al segundo se le adicionó una nueva porción del respectivo solvente fresco y se reextrajo dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se unieron y se centrifugaron a 7000 rpm durante 7 minutos, finalmente los extractos se aforaron a 10 mL con el solvente de extracción respectivo.

Método B: Ultrasonido

500 mg del polvo de la semilla se depositaron en un tubo de ensayo con 3 mL del solvente de extracción (TCA, Tris-HCl o Tris-Base) y se colocaron en un equipo de ultrasonido durante 20 minutos a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al cabo de este tiempo el material se decantó obteniéndose un sobrenadante y un pellet; el primero se retiró y se conservó, mientras que al segundo se le adicionó una nueva porción del respectivo solvente fresco y se reextrajo dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se unieron y se centrifugaron a 7000 rpm durante 7 minutos, finalmente los extractos se aforaron a 10 mL con el solvente de extracción respectivo.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible, aplicando las metodologías de Bradford (1976), Lowry et al. (1951) y el Kit de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). En los tres casos se realizó una curva patrón con seroalbúmina bovina (BSA) a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L. Cada uno de los patrones fue evaluado por triplicado.

Análisis estadístico

Para la elección del mejor método de cuantificación se obtuvieron las curvas de calibración de cada reactivo cromogénico empleado y a través de un análisis de regresión por mínimos cuadrados no ponderados con un nivel de confianza del 95%, se obtuvieron los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de cada metodología. Para cada análisis de regresión se validaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia mediante las pruebas de Shapiro-Wilk, Levene’s y Durbin-Watson respectivamente. Todo esto se realizó con el software Statgraphics Centurion XVI.II en modo demo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN |

Según se evidencia en las rectas de calibración (figura 1), para los casos donde el reactivo de cuantificación fue Bio-Rad o Bradford se obtuvieron modelos de regresión lineal simple que describieron el comportamiento de la señal en función de la concentración de manera lineal; mientras que para el caso en el cual el reactivo de cuantificación fue Lowry, el mejor modelo ajustado correspondió a un modelo cuadrático. Los modelos de regresión obtenidos para cada caso, donde “A” corresponde a la señal en unidades de absorbancia y “C” a la concentración en mg/L se presentan en cada gráfica de la figura 1.

A partir del análisis de las curvas (figura 1) y los valores de la regresión (tabla 1), se decidió el mejor método colorimétrico para la cuantificación. Para el análisis de la sensibilidad se empleó como parámetro de comparación la pendiente de cada uno de los modelos de regresión obtenidos (figura 1), y se hizo evidente que quien presentó una menor sensibilidad es el método que utilizó el reactivo Bio-Rad, dado que por cada mg/L que aumenta la concentración, la señal se incrementa desde $0,9382 \times 10^{-3}$ hasta $0,9950 \times 10^{-3}$ unidades de absorbancia; mientras que cuando se utilizó el reactivo Bradford, por cada unidad en aumento de la concentración en mg/L la señal se incrementa desde $2,196 \times 10^{-3}$ hasta $2,288 \times 10^{-3}$ unidades de absorbancia, para ambos casos con una significancia del 5%. Finalmente, dado que para el método que utilizó el reactivo de Lowry la regresión cuadrática fue la de mejor ajuste y esta no corresponde con la ley de Lambeert-Beer (Skoog et al. 2008), se puede concluir que el mejor método para la cuantificación fue el que empleó el reactivo Bradford, no solo por el hecho de que su ajuste es lineal y por ende las variaciones en la señal están sujetas a un mismo patrón de variación en todo el intervalo evaluado (lo cual no es posible en el comportamiento del modelo de regresión cuadrático), sino también por el hecho de que este protocolo presentó alteraciones bajas en las concentraciones y como fue reportado por Aminian et al. (2013) y Ku et al. (2013), es una técnica simple, rápida y con pocas interferencias. Esta técnica de cuantificación también fue usado por Sing et al. (2015), para detectar la cantidad de proteínas en semillas, hojas y flores de guandú (*Cajanus cajan*); lo cual demuestra

que es una metodología vigente para emplearse con diferentes extractos vegetales.

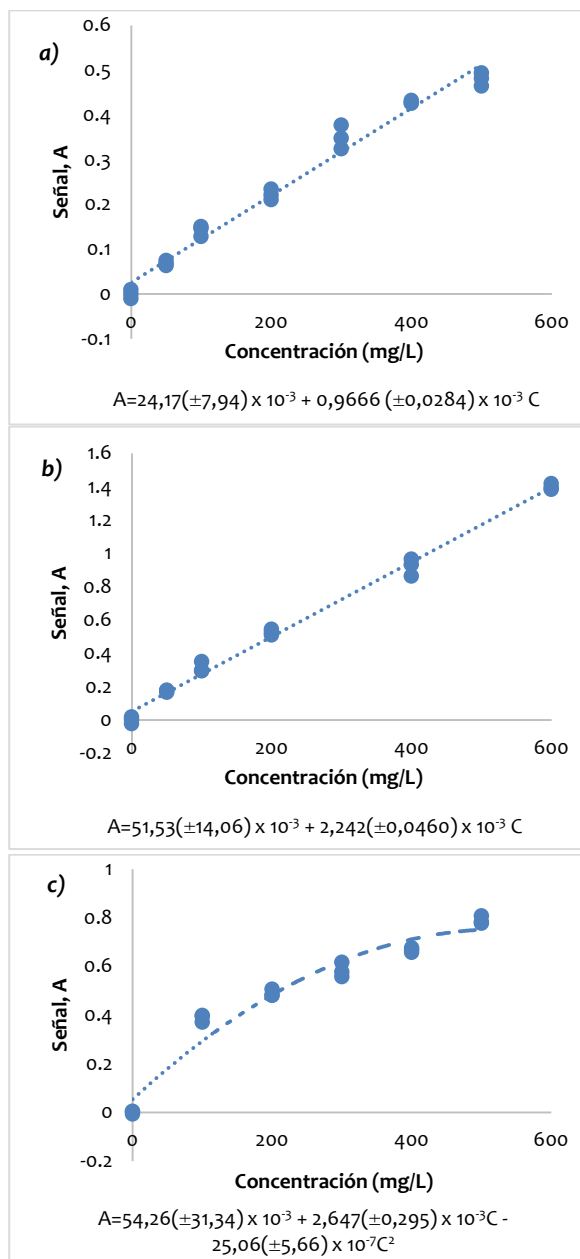


Figura 1. Rectas de calibración obtenidas con los reactivos: a) Bio-Rad, b) Bradford, c) Lowry.

Tabla 1. Valores del análisis de regresión no ponderado para la comparación de los tres reactivos de cuantificación empleados.

Reactivo	Intercepto	Pendiente de primer grado	LOD	LOQ	Coefficiente Determ. (R ²)
Bio-Rad	0,0241	0,0009665	0,0480	0,1036	98,4717%
Bradford	0,0515	0,0022418	0,0937	0,1921	99,3447%
Lowry	0,0542	0,0026466	0,1483	0,3677	94,6686%

Vale la pena resaltar que para todos los métodos colorimétricos evaluados, fue posible verificar los supuestos que validan la información brindada al hacer uso de la estadística paramétrica, dado que para todas las pruebas realizadas, las significancias obtenidas fueron mayores que la significancia de la prueba del 5% (p -valor $> 0,05$); es decir, en todos los casos los residuos se ajustaron adecuadamente a una distribución normal, las varianzas para las señales obtenidas para cada nivel de concentración fueron iguales y finalmente no existió dependencia alguna entre las mediciones realizadas para construir las rectas de calibración, o sea que en cada caso el conjunto de datos se distribuyó aleatoriamente.

Decidido el método colorimétrico para el análisis de las proteínas totales, se evaluaron los seis protocolos propuestos para la extracción de estas biomoléculas a partir de semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). En la figura 2 se presentan los resultados de estos ensayos.

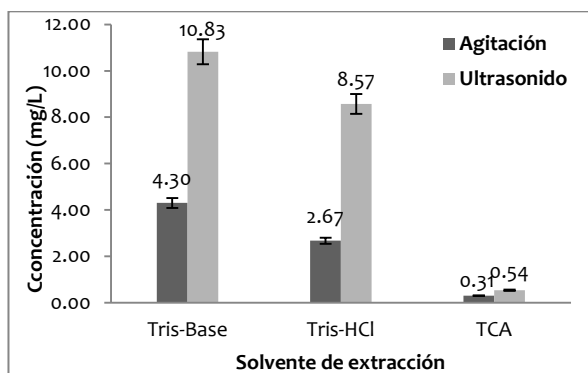


Figura 2. Valores de la concentración de proteínas por minuto, en función de los solventes y el método de extracción empleado, cuantificado mediante la metodología de Bradford.

Esto se correlaciona con lo expresado por Rostagno y Prado (2013), quienes propusieron al ultrasonido como un método con ventajas respecto a los protocolos convencionales de extracción, dado que acorta el tiempo del proceso, disminuye el volumen del solvente empleado, e incrementa el rendimiento extractivo. Esta mejora es atribuida al fenómeno de cavitación producido en el solvente, por el paso de la onda de ultrasonido (Paniwnyk et al. 2001), la cual genera un fenómeno de explosión/implosión de microburbujas de gas, que destruyen las partículas sólidas en la matriz analizada, mejorando el proceso de interacción entre la muestra y el solvente (Bodzon-Kulakowska, et al. 2007).

En cuanto al solvente de extracción, se observó que con el Tris-Base y el Tris-HCl se obtuvo mayor cantidad de proteína, mientras que el TCA no separó la cantidad suficiente para ser detectada espectrofotométricamente. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Aspelund, (2010), quien trabajó con maíz transgénico y reportó que las proteínas presentaron baja solubilidad en solventes con pH

bajo. También se correlaciona con lo reportado por Cho et al. (2006), quienes evaluaron diferentes especies y varias partes de plantas frente al buffer extractor TCA, y reportaron que este solvente fue muy bueno en la extracción de proteínas a partir de hojas de arroz, maíz, trigo, pepino y *Arabidopsis*; pero no fue tan bueno cuando se trabajó con semillas porque se produjo un precipitado difícil de reconstituir para análisis posteriores.

Finalmente, el Tris-Base fue el buffer más eficiente para la extracción de proteínas a partir de semillas de maíz, lo cual se puede explicar a partir de los estudios de Tavakolipour et al. (2015), quienes confirmaron a través de espectroscopía UV-VIS la ocurrencia de uniones químicas entre el ácido cítrico (componente del Tris-Base) y las proteínas tipo zeína. Vale la pena resaltar que de los cuatro grupos principales de las proteínas del maíz, las zeínas se encuentra en mayor proporción en el endospermo, con un porcentaje que oscila entre el 45% - 50% (Shukla y Cheryan, 2001). Además, Horax et al. (2011), al estudiar varias características de las proteínas de semillas de melón, encontraron que las condiciones óptimas para la extracción de proteínas fueron a un pH de 9, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, ya que el Tris-Base tiene un pH que oscila entre 7,0 y 9,2, mientras que el pH del Tris-HCl se encuentra en el intervalo 4,2 y 5,0.

De igual manera, los resultados de este trabajo concuerdan con los reportes de Ranjan et al. (2012) quienes, al comparar siete métodos de extracción de proteínas en diferentes leguminosas, encontraron que para los guisantes verdes, la soja verde y el garbanzo, la extracción con Tris-Base produjo el máximo rendimiento. Mientras que el proceso con Tris-HCl no fue ideal para solubilizar todo los tipos de proteínas presentes en los granos analizados, particularmente las proteínas de membrana u otras altamente hidrofóbicas (Görg et al. 2004). Es de aclarar que en la extracción, las proteínas deben su solubilidad a las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente, así como al balance hidrofóbico-hidrofílico en la superficie de las biomoléculas (Moure et al. 2006). Así pues, las soluciones tampón mejoran la estabilidad y mantienen la integridad de las proteínas, protegiéndolas, mientras las separa de otros componentes celulares (G-Biosciences, 2014).

CONCLUSIONES |

En los análisis químicos cuantitativos, la buena preparación de la muestra asegura un resultado confiable, independiente del método de cuantificación empleado. En los casos en los que se requiere hacer extracciones, es necesario hacer una apropiada elección del solvente y del método físico de trabajo porque cada protocolo se comporta de manera diferente según la especie y el tejido trabajado. En esta investigación se encontró que el mejor método para la obtención de las proteínas totales en semillas de maíz germinadas (*Zea mays* L.), fue la extracción asistida con ultrasonido empleando Tris-Base como solvente. Con este

procedimiento se obtuvieron, de manera rápida y sencilla, cantidades cuantificables de las moléculas en estudio.

Los procedimientos que requieren reactivos cromogénicos para hacer determinaciones analíticas cuantitativas, deben ser cuidadosamente evaluados porque pueden variar su respuesta según el medio de trabajo. La cuantificación espectrofotométrica de las proteínas totales presentes en muestras de semillas de maíz germinadas, fue mejor cuando se empleó el reactivo de Bradford. Con este protocolo se logró un análisis de bajo costo, confiable, sencillo, sensible y rápido.

AGRADECIMIENTOS |

Los autores agradecen a la Universidad de Caldas por el apoyo financiero mediante el proyecto de investigación código 1739413.

REFERENCIAS |

- Aminian M. Nabatchian F. Vaisi-Raygani A. y Torabi M. 2013. Mechanism of coomassie brilliant blue G-250 binding to cetyltrimethylammonium bromide: an interference with the Bradford assay. *Analytical Biochemistry*, 434: 287-291.
- Aspelund M.T. 2010. Membrane-based separations for solid/liquid clarification and protein purification. Graduate Theses and Dissertations. Paper 11771.
- Aspelund M.T. y Glatz C.E. 2010. Purification of recombinant plant-made proteins from corn extracts by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 353: 103-110.
- Asturias M.A. 2004. Maíz, de alimento sagrado a negocio del hambre. *Acción ecológica. Red por una América Latina libre de transgénicos. Hivos. Quito.* p. 9-26.
- BIO-RAD Protein Assay. http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf y http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lr/literature/Bulletin_1069.pdf. Páginas consultadas el 19 de agosto de 2014.
- Bodzon-Kulakowska A. Bierzczynska-Krzysk A. Dylag T. Drabik A. Suder P. Noga M. Jarzebinska J. y Silberring J. 2007. Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatography B*, 849: 1-31.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cho K. Torres N.L. Subramanyam S. Deepak S.A. Sardesai N. Han O. Williams C.E. Ishi H. Iwahashi H. y Rakwal R. 2006. Protein extraction/solubilization protocol for monocot and dicot plant gel-based proteomics. *Journal of Plant Biology*, 49: 413-420.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2010. Trends in the Crop Sector: FAO. <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e03b.pdf>.
- FENALCE. 2010. El cultivo del maíz, historia e importancia. El Cerealista. Colombia.
- García H. y Vázquez R. 1998. Cuantificación de proteínas: Una revisión. *BioTecnología*, 3: 77-88.
- G-BIOSCIENCES. A Geno Technology, Inc. (USA) Brand 2014.
- Ghafoor A. Ahmad Z. Qureshi A.S. y Bashir M. 2002. Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE. *Euphytica*, 123: 367-378.
- Görg A. Weiss W. y Dunn M.J. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Review. Proteomics*, 4: 3665-3685.
- Horax R. Hettiarachchy N. Kannan A. y Chen P. 2011. Protein extraction optimization, characterization, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chemistry*, 124: 545-550.
- <http://info.gbiosciences.com/blog/bid/152959/What-is-the-Role-of-Buffer-System-in-Protein-Extraction-and-Clearification>. Página consultada el 19 de febrero de 2015.
- Kellogg E.A. 2001. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology*, 125: 1198-1205.
- Ku H-K. Lim H-M. Oh K-H. Yang H-J. Jeong J-S. y Kim S-K. 2013. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models. *Analytical Biochemistry*, 434: 178-180.
- Lowry O.H. Rosebrough N.J. Farr A.L. y Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Moure A. Sineiro J. Domínguez H. y Parajó J.C. 2006. Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39: 945-963.
- Natarajan S. Xu C. Caperna T.J. y Garrett W.M. 2005. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry*, 342: 214-220.
- Paniwnyk L. Beaufoy E. Lorimer J. P. y Mason T.J. 2001. The extraction of rutin from flower buds of *sophora japonica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 299-301.
- Ranjan S. Matcha R. Madhuri B. y Babu N. 2012. Comparative evaluation of protein extraction methods from few leguminous seeds. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 3: 558-563.
- Rostagno M.A. y Prado J.M. 2013. Natural product extraction: principles and applications. The Royal Society of Chemistry, Londres: RSC Publishing. 89-104.
- Shukla R. y Cheryan M. 2001. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13: 171-192.
- Singh N. Jain N. Kumar R. Jain A. Singh N.K. y Rai V. 2015. A comparative method for protein extraction and 2-D gel electrophoresis from different tissues of *Cajanus cajan*. *Frontiers in Plant Science*. 6:606.
- Skoog D.A. Holler F.J. y Crouch S.R. 2008. Principios de análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning Editores. México D.F.
- Tavakolipour H. Bagheri L. y Madadlou A. 2015. Pomegranate seed oil-loaded particles of the zein cross-linked with citric acid. *Journal of Food Process Engineering*, 38: 49-56.
- Wegary D. Labuschagne M.T. y Vivek B.S. 2011. Protein quality and endosperm modification of quality protein maize (*Zea mays* L.) under two contrasting soil nitrogen environments. *Field Crops Research*, 121: 408-415.