



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN  
EN ARVEJA (*PISUM SATIVUM*) POR POLARIMETRÍA**

**Claudio Gabriel Aquilano**

**TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**TUTOR: Bioq. MSc. Mabel Percibaldi  
CO TUTOR: Dra. Ana María Di Martino**

**AÑO 2021**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN EN ARVEJA (*PISUM SATIVUM*) POR POLARIMETRÍA**

Claudio Gabriel Aquilano

Este trabajo de Tesina es presentado como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional de Rosario. El mismo contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el en el Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Agua de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Pergamino del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) durante el período comprendido entre octubre de 2019 hasta julio 2021, bajo la dirección de MSc. Percibaldi Nora Mabel y Dra. Ana María Di Martino.



Claudio Gabriel Aquilano



Nora Mabel Percibaldi



Ana María Di Martino

Fecha de entrega: 02 de julio de 2021

## AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, MSc. Nora Mabel Percibaldi y Dra. Ana María Di Martino, por su colaboración y transferencia de conocimientos, aportes fundamentales para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Semillas, a todos los integrantes del Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Agua de la EEA Pergamino y al INTA por la posibilidad de completar mi estudio de Grado Universitario.

A la Dra. Gabriela Grigioni, coordinadora actual y la Dra. Adriana Descalzo, coordinadora inicial del Proyecto Estructural de Investigación INTA (PE I517): *“Calidad nutricional y sensorial de alimentos asociada a diversos sistemas de producción agropecuaria”*, y en especial a la Dra. María José Martínez, responsable de la línea: *“Identificación de propiedades físico-químicas y nutricionales de las variedades de garbanzo, poroto, arveja y maní mejorados por INTA, y sus mezclas para elaboración de alimentos enriquecidos en proteínas y fito nutrientes. Identificación de elementos geoquímicos en el suelo y el grano de estas legumbres secas para asociación con denominación geográfica”* y a todos aquellos que de alguna manera colaboraron en la realización de esta tesina.

A mi pareja por el apoyo incondicional en cada proyecto y decisión.

A todos ellos muchas gracias.

## INDICE

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Generalidades de las leguminosas .....	9
1.2. Cultivo de legumbres en general y arvejas en particular .....	10
1.3. Estructura y composición química del grano de arveja .....	12
1.4. Beneficios para la salud asociado al consumo de arveja y legumbres en general	16
1.5. Formas de consumo y procesamiento de arvejas .....	17
1.6. Importancia de la determinación del contenido de almidón de arveja .....	24
1.7. Técnicas de cuantificación del almidón de arveja .....	25
1.8. Validación metodológica .....	27
1.9. Criterios de validación. Definiciones .....	28
1.10. Antecedentes.....	31
1.11. Hipótesis.....	31
2. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	32
2.1. Objetivo general.....	32
2.2. Objetivos específicos .....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. Material utilizado.....	33
3.2. Metodología.....	33
3.2.1. Campo de aplicación .....	33
3.2.2. Fundamento del método.....	33
3.2.3. Instrumental y elementos de laboratorio .....	34
3.2.4. Drogas y Reactivos.....	35
3.2.5. Preparación de la muestra.....	35
3.2.5.1. Molienda.....	35
3.2.6. Procedimientos analíticos.....	35
3.2.6.1. Determinación de humedad.....	35
3.2.6.2. Determinación de almidón por la técnica de Almidones y féculas nativos. Determinación del contenido de almidón, Método polarimétrico de Ewers. ....	36
3.2.6.2.1. Determinación del poder rotatorio total (P) .....	36
Hidrólisis.....	36
Clarificación.....	37
Determinación del poder rotatorio.....	37

3.2.6.2.2. Determinación de la rotación óptica (P') de sustancias solubles en etanol al 40 % v/v .....	37
Solubilización de la muestra .....	37
Hidrólisis .....	37
Clarificación .....	37
Determinación del poder rotatorio .....	38
3.2.7. Cálculos y expresión de los resultados .....	38
3.3. Puesta en marcha de la metodología en el LCASyA.....	39
3.3.1. Acondicionamiento .....	39
3.3.2. Ejecución del método .....	39
3.3.3. Verificación del método .....	39
3.3.3.1. Determinación de la repetibilidad .....	39
3.3.3.2. Determinación de la reproducibilidad.....	39
3.3.3.3. Determinación de la veracidad .....	39
4. RESULTADOS .....	41
4.1. Puesta en marcha de la metodología.....	41
4.2. Verificación del método polimétrico.....	42
4.2.1. Resultados de la prueba de repetibilidad .....	42
4.2.2. Resultados de la prueba de reproducibilidad .....	43
4.2.3. Resultados de la prueba de veracidad.....	43
5. DISCUSIÓN.....	45
6. CONCLUSIONES .....	45
7. BIBLIOGRAFÍA.....	46

# IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN EN ARVEJA (*PISUM SATIVUM*) POR POLARIMETRÍA

## ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

<b>AR</b>	Almidón resistente.
<b>BS</b>	Base seca.
<b>C.A.A.</b>	Código Alimentario Argentino.
<b>d</b>	Densidad, se expresa en gramos por mililitros.
<b>FAN</b>	Factores antinutritivos.
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
<b>g</b>	Gramo.
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
<b>INTI</b>	Instituto Nacional de Tecnología Industrial.
<b>ISO</b>	Del ingles (International Organization for Standardization).
<b>kcal</b>	Kilocaloría.
<b>l</b>	Litro.
<b>LCASyA</b>	Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Agua.
<b>M</b>	Molar, es la concentración en mol por litro.
<b>mg</b>	Miligramo.
<b>ml</b>	Mililitro.
<b>mm</b>	Milímetro.
<b>mol</b>	Es la cantidad de sustancia de una entidad elemental (átomo, molécula, ion, electrón o cualquier otra partícula) equivalente a $6,02 \times 10^{23}$ unidades.
<b>°C</b>	Grados centígrados.
<b>PROCAL</b>	Proyecto de Asistencia Integral para el Agregado de Valor en Agroalimentos.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>SAGyP</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca.
<b>% v/v</b>	Expresa el volumen de soluto por cada cien unidades de volumen de la disolución.
<b>µg</b>	Microgramo.
<b>µm</b>	Micrómetro, micrón o micra.

## RESUMEN

Las arvejas (*Pisum sativum*) pertenecen a la familia de las leguminosas o legumbres. Las legumbres desempeñan una función fundamental en la alimentación saludable y en la producción sostenible de alimentos.

Las arvejas son una valiosa fuente de proteínas, minerales, vitaminas y tienen muy bajo contenido de lípidos. Entre los carbohidratos contienen azúcares, almidones y celulosa.

Conocer la composición de las materias primas es de sumo interés para el sector agroalimentario, por ello es necesario utilizar técnicas de cuantificación precisas para lograr productos terminados de mejor calidad nutricional.

Los carbohidratos en solución son sustancias ópticamente activas, es decir que tienen la propiedad de rotar el plano de luz polarizada. Esta propiedad es la base de la metodología polarimétrica. Es por ello, que en el Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Agua (LCASyA) de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Pergamino se trabajó en la puesta a punto de una metodología para determinar el contenido de almidón en arveja por polarimetría, objetivo de esta Tesina.

La finalización de este trabajo le permitió al LCASyA contar con una nueva metodología para la cuantificación de almidón en arveja. Por otro lado, se concluye que la metodología implementada es precisa, demostrado en las pruebas de Repetibilidad y Reproducibilidad y expresado por los coeficientes de variación obtenidos en ambas pruebas. También, se demostró que trabajando con un nivel de confianza del 95 %, y 5 grados de libertad no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos al comparar valores teóricos y experimentales para la cuantificación de almidón en arvejas por esta metodología.

## **ABSTRACT**

Peas (*Pisum sativum*) belong to the legume family. Legumes play a special role in healthy nutrition and sustainable food production.

Peas are a valuable source of protein, minerals, vitamins and have a very low level of lipids. Among the carbohydrates they contain sugars, starches and cellulose.

Knowing the composition of raw materials is of great interest to the agri-food sector, therefore it is necessary to use precise quantification techniques for high nutritional quality food production.

Carbohydrates in solution are optically active substances, that is, they have the property of rotating the angle of a polarized light beam. This property is the basis of the polarimetric methodology. For this reason, the Food, Soil and Water Quality Laboratory (LCASyA) of the EEA INTA Pergamino worked on the development of a methodology to determine the starch content in peas by polarimetry, which is the objective of this Thesis.

The completion of this work allowed the LCASyA to access a new starch quantification in peas technique. On the other hand, it is concluded that the implemented methodology is accurate and reproducible, demonstrated in the Repeatability and Reproducibility tests, according to the variation coefficients obtained in both tests. Also, it was shown that working with a confidence level of 95 %, and 5 degrees of freedom, there are no significant differences in the results obtained when comparing theoretical and experimental values for the quantification of starch in peas by this methodology.



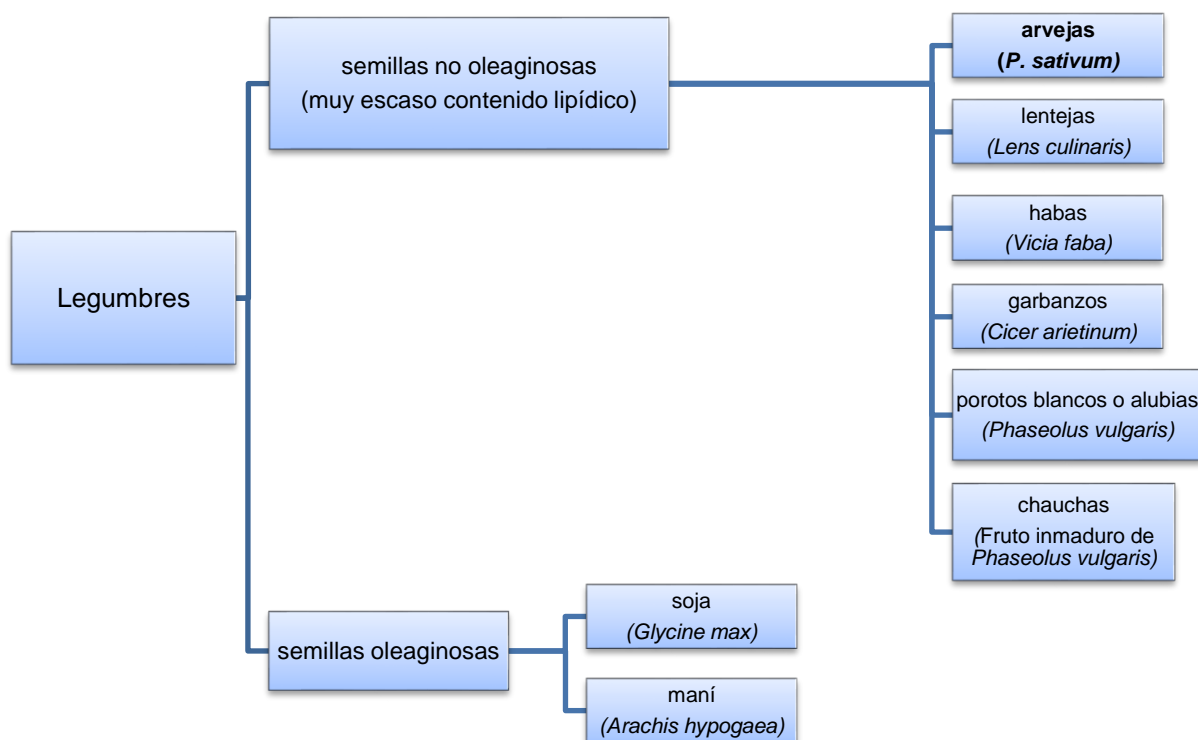
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de las leguminosas

Las leguminosas o fabáceas, son las plantas de las que se cosechan las legumbres, que son un fruto formado por una vaina que encierra en su interior una semilla o una hilera de semillas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

El Código Alimentario Argentino (C.A.A.) define en el capítulo XI del Artículo 877 “Con el nombre de Legumbres, se entiende a los frutos y las semillas de las leguminosas” y en el artículo 878 “Con el nombre de arveja, alverja o guisante, se entiende a la semilla fresca o desecada de *Pisum sativum* L.” (C.A.A., 2013).

En la **Figura 1** se observan las principales legumbres y su clasificación según el contenido de aceite.



**Figura 1.** Legumbres de consumo habitual en nuestro país. Adaptado de Basterra et al. (2016).

Las principales legumbres consumidas por los humanos son los porotos, garbanzos, arvejas, lentejas, habas, lupinos, maní y soja; mientras que las que se emplean para alimentar al ganado, se destacan: alfalfa, trébol y vicia entre otras. (FAO, 2016b).

Aunque estas semillas comestibles son consumidas desde hace miles de años por seres humanos y animales, en general su valor nutricional no es reconocido adecuadamente y con frecuencia su consumo es menor a lo recomendado. Esta falta de reconocimiento es inmerecida, puesto que las legumbres desempeñan una función fundamental en la alimentación saludable, en la producción sostenible de alimentos y, sobre todo, en la seguridad alimentaria (FAO, 2016a).

## **1.2. Cultivo de legumbres en general y arvejas en particular**

La región productora de legumbres en la Argentina es el NOA (Salta, Jujuy, Santiago del Estero y Tucumán), aunque también crece en otras regiones (Catamarca, San Juan, Mendoza, San Luis, Córdoba, Formosa, Misiones y Santa Fe, Entre Ríos y norte de Bs.As.). Es una actividad generadora de mano de obra, y trae arraigado el saber de generaciones de productores que se dedican a estos cultivos de especialidad (IERAL de Fundación Mediterránea, 2011).

Según Prieto et al. (2019) el cultivo de arvejas se concentra en el área del sudeste de Santa Fe y nordeste de Buenos Aires. Se trata de un cultivo de invierno, habiéndose adaptado a la siembra directa. Entre los meses de julio hacia fines de agosto se extiende la siembra de este cultivo. Según Basterra et al. (2016) las variedades más representativas son “Facón” y “Viper”.

Argentina tiene uno de los niveles más bajos de consumo de legumbres a nivel mundial, esto puede deberse al largo tiempo requerido para preparaciones culinarias, y al malestar digestivo que pueden generar. El consumo per cápita se ubica entre los 250-700g/habitante/año mientras que en otros países el promedio es de 6000g/habitante/año. Por este motivo, el excedente de producción se destina a la exportación (Bolsa de Comercio de Rosario, 2019). A continuación, se detallan las exportaciones en los últimos años de las legumbres más cultivadas en nuestro país (**Gráfico 1**), también se puede observar la producción nacional de arvejas (**Gráfico 2**) y su destino internacional, siendo Brasil el principal país importador de nuestros granos (**Gráfico 3**).

## Exportaciones argentinas de legumbres

@BCRmercados en base a datos de INDEC y SENASA

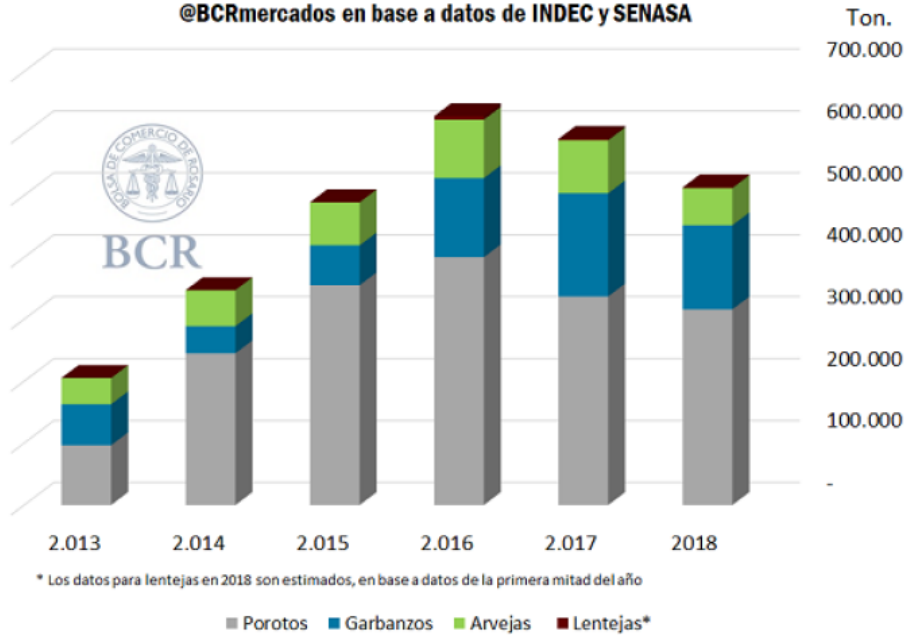


Gráfico 1. Fuente Bolsa de Comercio de Rosario (2019).

## Producción de Arvejas en Argentina

@BCRmercados en base a datos de FAO y Agroindustria

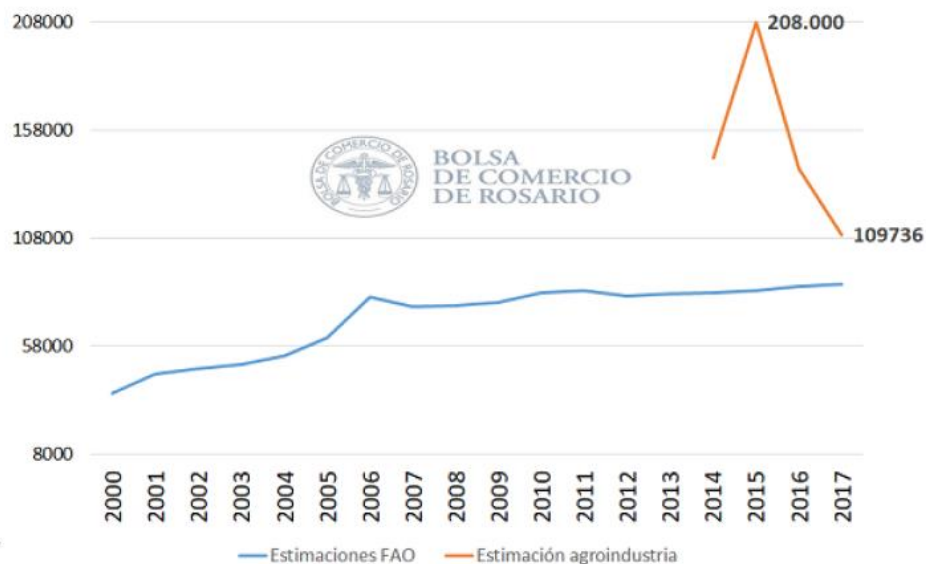
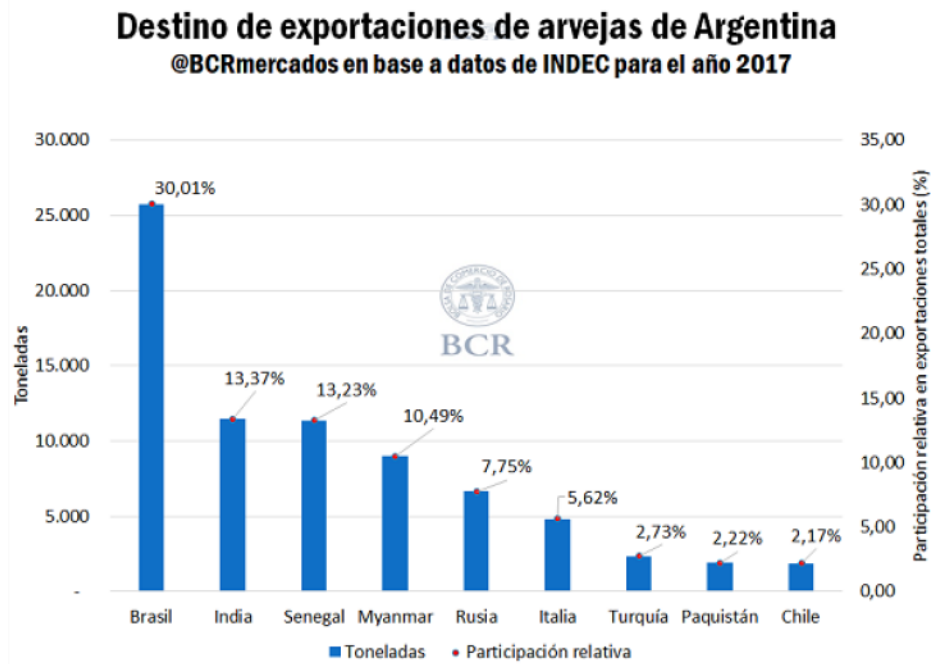


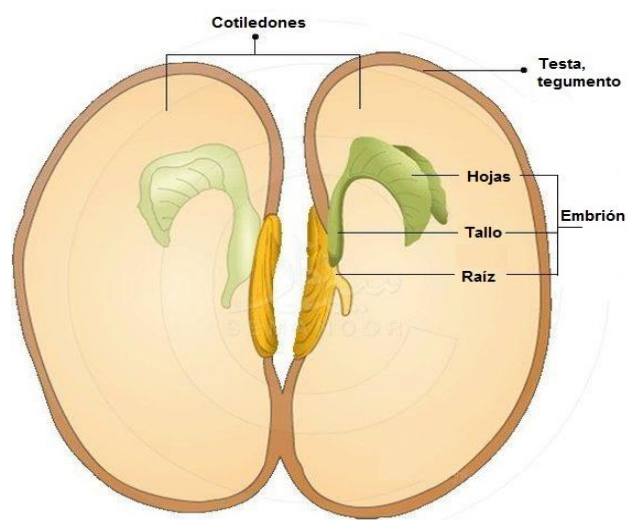
Gráfico 2. Fuente Bolsa de Comercio de Rosario (2019).



**Gráfico 3.** Fuente Bolsa de Comercio de Rosario (2019).

### 1.3. Estructura y composición química del grano de arveja

Según Alasino (2009) la arveja, es una especie dicotiledónea anual, perteneciente a las familias de las fabáceas (papilionáceas). El género *Pisum* contiene dos especies, *P. Fulvum* y *P. Sativum*. Esta última tiene dos variedades, una de ella se cultiva como hortaliza y la otra se utiliza como forraje. En la siguiente **Figura 2** se detallan las partes principales de un grano de arveja.



**Figura 2.** Grano de arveja y sus estructuras. Adaptado de Chablé Moreno (2017).

Las arvejas son una valiosa fuente de proteínas, cuyo valor biológico se incrementa cuando se consumen junto a cereales, ello permite una amplia versatilidad y su aplicación en muchas preparaciones culinarias. También aportan minerales como hierro, cinc, calcio entre otros, no obstante, se recomienda acompañar con alimentos frescos, verduras y frutas, que al sumar vitamina C, mejoran la absorción intestinal de algunos nutrientes, específicamente el hierro. Además, contienen vitaminas mayormente del grupo B, también contienen vitamina E que actúa como antioxidante, estas son muy importantes para un buen metabolismo, contractibilidad muscular y en las primeras etapas del embarazo. Tienen muy bajo contenido de lípidos, al ser de origen vegetal no tienen colesterol y regulan el metabolismo de lípidos en sangre (Alimentos Argentinos, 2014). A continuación, se detallan la composición química de granos de arvejas (**Tabla 1**):

**Tabla 1.** Composición química en 100g de semilla de arveja. Adaptado de FAO(2016b) y Alasino (2009).

Nutriente	Valor en 100 gramos de parte comestible seca
Energía	308 kcal
Proteínas	18,44 g
Grasas	1,4 g
Fibra	26 g
<b>Carbohidratos</b>	<b>42,4 g</b>
Hierro	3,5 mg
Magnesio	116 mg
Fosforo	295 mg
Potasio	1010 mg
Cinc	2,39 mg
Vitamina B9 / Folato	138 mg
Vitamina A	110,2 µg
Vitamina E	menor a 0,1 mg
Vitamina K	99,12 µg

Respecto a los carbohidratos, nutricionalmente existen tres grupos principales: azúcares, almidones (o féculas) y celulosa. Los azúcares y almidones son la principal fuente de energía para el ser humano y la celulosa es uno de los componentes principales de la fibra dietaria.

Olmedilla et al. (2010) definen como almidón resistente (AR) al "almidón y productos de degradación del almidón no absorbidos en el intestino delgado de personas sanas". Se encuentran cuatro formas diferentes de AR según Fuentes Zaragoza et al. (2010):

AR uno, este almidón se encuentra inaccesible físicamente para el ataque enzimático porque las paredes celulares permanecen intactas. Se encuentran en granos parcialmente molidos y semillas enteras.

AR dos, gránulos de almidón crudo o nativos. No puede ser atacado enzimáticamente si antes no se gelatiniza. Se encuentra en las papas crudas, plátano verde y maíz.

AR tres, almidones retrogradados en los alimentos preparados. Los almidones de los alimentos preparados se pueden volver parcialmente indigeribles por procesos de calentamiento y posteriormente un enfriamiento. Este tipo de almidones lo encontramos en pan, copos de cereales, alimentos precocinados, papas cocidas y enfriadas.

AR cuatro, almidón modificado químicamente que no pueden ser atacados por las enzimas. Se lo prepara industrialmente para ser usado en la elaboración de alimentos procesados como pasteles, salsas industriales y alimentos infantiles.

El AR uno es el que se encuentra en las legumbres en general, debido a la gruesa pared celular que tienen hace que el almidón sea inaccesible al ataque enzimático.

Las arvejas, pese a sus ventajas desde el punto de vista nutritivo, presentan en su composición una serie de sustancias llamadas factores antinutritivos (FAN), que en algunos casos pueden afectar a la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes. Ellos son taninos, inhibidores de proteasa, fitohemaglutininas, saponinas, factores de flatulencia, fitatos, isoflavonas; afortunadamente muchos de ellos son termolábiles, por lo que se eliminan durante los procesos de cocción (Rubio L. et al., 1994; Larralde & Martínez, 1989).

El mecanismo de acción de los distintos FAN difiere en cada uno de ellos. A continuación, se detallan:

- Los taninos disminuyen la digestibilidad proteica, además produce inactivación de enzimas y la inhibición de la absorción intestinal de azúcares (Carmona et al., 1996; Jansman et al., 1994; Macarulla et al., 1989).
- Los inhibidores de las proteasas, son responsables de la baja digestibilidad de las proteínas, lo que afecta a la disponibilidad de los aminoácidos. Esta acción se debe a la capacidad de inhibir la acción de enzimas digestivas como la tripsina y quimiotripsina (Birk, 1996; Al-Wesali et al., 1995; Savelkoul et al., 1992; Savage & Deo, 1989).
- Las fitohemaglutininas o lectinas, actúan disminuyendo el transporte de nutrientes a través de la pared intestinal, hipertrofia de la mucosa, inhibición de las hidrolasas del borde en cepillo, precipitación de eritrocitos y alteraciones en el sistema inmunitario (Liener, 1996; Savelkoul et al., 1994; Licastro et al., 1993).
- Las saponinas producen alteración de la permeabilización del intestino (Ayet et al., 1996; Johnson et al., 1986).
- Los fitatos se unen a los minerales de las leguminosas reduciendo su biodisponibilidad, estos compuestos junto con los polifenoles presentes constituyen el principal inhibidor de la absorción de hierro y cinc (Sandberg, 2002).
- La flatulencia producida por consumir este tipo de alimento es causada por la presencia de hidratos de carbono como galactósidos (verbascosa, rafinosa, estaquiosa) que son fermentados por la flora intestinal. Otros hidratos de carbono como la celulosa, la hemicelulosa, la pectina, procedentes de las paredes celulares de la semilla, no son digeribles y forman parte de la fibra dietaria aumentando el volumen de las heces y generando un efecto beneficioso para la salud (Belitz & Grosh, 1997).
- Las isoflavonas son algunos de los compuestos asociados a la capacidad antioxidante de las semillas, principalmente encontradas en semilla de soja. El problema es que este compuesto antioxidante se encuentra en baja disponibilidad en el grano. Este inconveniente se puede subsanar efectuando un remojo y germinación, como así también realizando una cocción de los granos.

#### **1.4. Beneficios para la salud asociados al consumo de arveja y legumbres en general**

- Las arvejas tienen un contenido bajo de calorías, alto contenido en carbohidratos complejos y en fibra, lo cual significa que se digieren lentamente y dan una sensación de saciedad. Gran parte de la fibra no se absorbe, aumentando el volumen de las heces y la defecación. Además, la fibra puede favorecer la eliminación de toxinas y colesterol del organismo, generando complejos que no pueden ser metabolizados por el intestino.
- Son ideales para las personas que tienen diabetes debido a que poseen un bajo índice glicémico, un bajo contenido en grasa y un alto contenido en fibra. El gran contenido en fibra de las legumbres contribuye a estabilizar los niveles de azúcar e insulina en la sangre, reduciendo los picos después de comer y mejorando la resistencia a la insulina. Además, por el tipo de almidón de las leguminosas (AR uno) se reduce la disponibilidad de glucosa en sangre por la disminución del ataque enzimático al AR, reduciendo la demanda de insulina (Osorio Díaz et al., 2008). Todo ello convierte a las legumbres en alimentos ideales para el control de peso.
- Son fuentes de vitaminas como el folato, que reduce considerablemente el riesgo de anomalías congénitas del tubo neural y la espina bífida en los recién nacidos.
- El alto contenido en hierro ayuda a prevenir la anemia ferropénica en mujeres y niños, combinándose con alimentos que contengan vitamina C para mejorar la absorción del hierro.
- Contienen compuestos bioactivos como sustancias fitoquímicas y antioxidantes, que favorecen a la salud.

Un estudio demuestra que el consumo de cuatro raciones a la semana de legumbres disminuye un 22% el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, comparado con personas con ingesta menor (Bazzano et al., 2011).

Existen proyectos a nivel internacional y nacional para impulsar el consumo y la producción de las legumbres. Podemos citar, la declaración de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) del 2016 como “Año internacional de las legumbres”, con el objetivo principal de crear mayor conciencia de la contribución de las legumbres a la seguridad alimentaria. En Argentina, en el año 2014 surgió el Proyecto de Asistencia Integral para el Agregado de Valor en Agroalimentos (PROCAL), y como parte del



mismo comenzó el “Proyecto de Asistencia Integral en Sistema de Gestión de Calidad y Promoción del consumo interno de legumbres”.

### 1.5. Formas de consumo y procesamiento de arvejas

Las arvejas pueden ser consumidas en forma de grano cuando están inmaduro y en su estadio de madurez fisiológico. En el estadio verde deben ser consumidas de manera inmediata por ser alimentos muy perecederos, se las encuentra en las huertas hogareñas, verdulería o supermercados comercializándose como se muestra en la **Figura 3**; y se consumen en ensaladas y otras preparaciones.

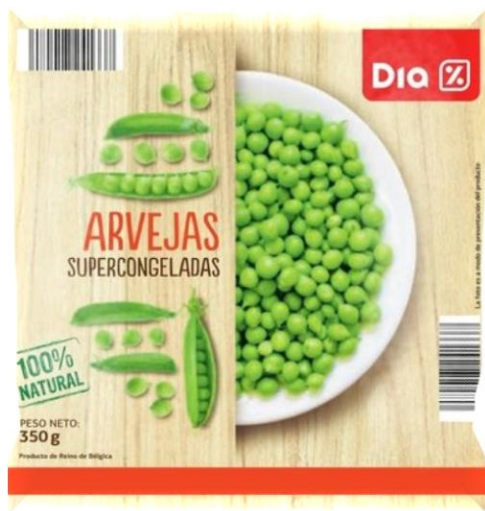
Estos granos inmaduros pueden ser procesados para aumentar la vida útil del alimento, para ello en la industria alimentaria se aplican procedimientos de secado (**Figura 4**), de congelación (**Figura 5**) y de conserva (**Figura 6**).



**Figura 3.** Arveja fresca. Fuente <https://gardenseedsmarket.com>



**Figura 4.** Arveja seca partida. Fuente <https://www.elmercadersaludable.com>



**Figura 5.** Arveja congelada. Fuente <https://diaonline.supermercadosdia.com.ar>

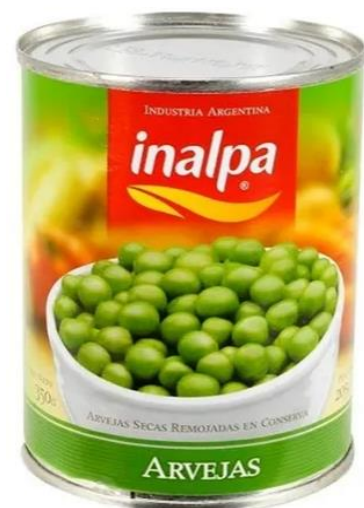


**Figura 6.** Arveja conserva. Fuente <https://www.zenu.com.co>

Las arvejas cuando se cosechan en madurez fisiológica, se aumenta su vida útil. Estas se comercializan como: son arvejas secas (**Figura 7**) y más habitualmente arvejas secas remojadas en conserva (**Figura 8 y Figura 9**).



**Figura 7.** Arveja seca. Fuente <https://sites.google.com>



**Figura 8.** Arveja seca remojada en conserva. Fuente <https://www.tiendeo.com.ar>



**Figura 9.** Arveja seca remojada en Tetra pack. Fuente <http://marcelafittipaldi.com.ar>

Para obtener las arvejas congeladas y arvejas en conserva, la industria lleva a cabo las etapas generales que se detallan en la **Tabla 2** para la obtención de arvejas congeladas (como materia prima se utiliza arveja verde) y en la **Tabla 3** para la obtención de arvejas en conserva (como materia prima se utiliza arveja verde y arveja seca).

**Tabla 2.** Procesamiento para obtención de arvejas congeladas. Adaptado de [https://tecnologiaalimentaria.com/proceso\\_arvejas\\_congeladas.html](https://tecnologiaalimentaria.com/proceso_arvejas_congeladas.html)

Etapas del procesamiento	Productos con valor agregado
Recepción, limpieza y acondicionamiento	-
Clasificación	<b>Arvejas enteras</b>
Escaldado	-
Congelación	-
Envasado	<b>Arveja verde congelada</b>

**Tabla 3.** Procesamiento para obtención de arvejas en conserva. Adaptado de <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=206>

<b>Etapas del procesamiento</b>	<b>Productos con valor agregado</b>
Recepción, limpieza y acondicionamiento	-
Clasificación	<b>Arvejas enteras</b>
Escaldado	-
Envasado	-
Esterilización comercial	<b>Arveja seca enlatada</b> <b>Arveja verde enlatada</b> <b>Arveja seca Tetra pack</b> <b>Arveja verde Tetra pack</b>

Además, otra utilización de los granos maduros es el proceso de molienda para la obtención de harina de arveja (**Tabla 4**) y el fraccionamiento para la obtención de almidón y proteína (**Tabla 5**). A partir del fraccionamiento se obtienen los aislados o concentrados proteicos y el almidón, y en general se obtiene un producto rico en fibra a partir de la cáscara o cubierta de las semillas que se descarta en las primeras etapas del proceso.

Estos subproductos obtenidos de la molienda seca son utilizados como materias primas o ingredientes en elaboración de alimentos industriales o preparaciones culinarias.

Las harinas de legumbres son usadas para aumentar el contenido y la calidad proteica de alimentos. Por ejemplo, la harina de arvejas es usada actualmente en el procesamiento de productos cárnicos, posee excelente estabilidad y resistencia mecánica a altas temperaturas. Este producto es utilizado en la formulación de conservas de carne enlatada, embutidos cocidos, patés y otros productos similares (Parzanese, 2015).

El almidón aislado de legumbres tiene propiedades únicas, tal como la estabilidad a altas temperaturas y su viscosidad elevada respecto al almidón derivado de cereales o tubérculos. Por ejemplo, el almidón derivado de arvejas se puede utilizar como aglutinante, espesante, gelificante y mejorador de textura. Sus características lo hacen funcional a distintos alimentos, ya sea en productos cárnicos como así también en productos enlatados, productos de confitería, sopas, salsas, postres. La principal limitación para el uso de este almidón es el relativo alto costo del fraccionamiento (Iciar Astiasarán & Martínez, 2000).

**Tabla 4.** Procesamiento para obtención de harina de arvejas.

<b>Etapas del procesamiento</b>	<b>Productos con valor agregado</b>
Recepción, limpieza y acondicionamiento	-
Clasificación	<b>Arvejas enteras</b>
Descorticado	-
Separación del cotiledón de la testa	<b>Arvejas partidas</b>
Molienda	<b>Harina de arveja</b>

**Tabla 5.** Procesamiento de arvejas para la obtención de fracciones de almidón y proteínas.

<b>Etapas del fraccionamiento</b>	<b>Productos con valor agregado</b>
<p><b>Método húmedo</b></p> <p>(Remoción de cascara/molienda/solubilización de componentes/tamizado)</p>	<p>almidón</p> <p>y</p> <p>proteína</p>
<p><b>Método seco</b></p> <p>(Recepción/limpieza/acondicionamiento/clasificación/descorticado/separación del cotiledón de la testa/molienda)</p>	<p>almidón</p> <p>y</p> <p>proteína</p>

Se detallan las etapas generales para el procesamiento industrial de arveja según Parzanese (2015):

- **Recepción, limpieza y acondicionamiento:** luego de la recepción se realiza la limpieza con aire a presión sobre una mesa que se encuentra en continua vibración e inclinada, las más pesadas sedimentan y las más livianas recorren la cubierta hacia la parte final que está más elevada. De esta forma, se logra separar las distintas fracciones y obtener finalmente granos limpios.

- **Clasificación:** se lleva a cabo en equipos similares a los que se usan para la limpieza incorporando zarandas de acuerdo al calibre de la semilla deseado. Luego de la clasificación el producto es sometido a una segunda limpieza para eliminar por completo el polvo. Además, pueden ser sometidas a una clasificación por color utilizando un clasificador electrónico, a fin de obtener un producto final de color uniforme.

Adicionalmente, se lleva a cabo una etapa de detección de metales para disminuir el riesgo de contaminantes de origen metálico en el producto final, además de evitar daños en los equipos de las líneas siguientes.

- **Decorticado:** consiste en dos etapas:
  - A. Ablandamiento de la cáscara (por método seco o húmedo).
  - B. Remoción de la cubierta o cáscara y limpieza.
- **Separación del cotiledón de la testa:** adicionar agua previa a la etapa de decorticado ayuda a llevar a cabo la división. La división de las cubiertas externas de la semilla (tegumento, testa o cubierta seminal) del germen y del cotiledón se realiza utilizando tamices de distintos tamaños. La fracción sobrante de granos que permanece entero se reprocesa.
- **Molienda:** luego de que los granos han sido divididos (separado el cotiledón de la cubierta y del germen) se realiza la molienda. La reducción del tamaño de partícula debe llevarse a cabo para incrementar el área interfacial de los granos, aumentando de esa forma la eficiencia y disponibilidad de secado.

Existen cuatro tecnologías de molienda disponibles que son las más aplicadas en la obtención de harina de legumbres:

- **Por impacto:** implica el uso de un objeto de gran dureza para golpear a un área amplia de las partículas y fracturarlas, se usan martillos o cuchillas.

La molienda mecánica por molinos de martillos se basa en la compresión del material entre dos cuerpos metálicos, aptos para el contacto con alimentos.

En la superficie inferior del martillo se dispone el tamiz, que filtra las partículas luego de la molienda. En general el tamiz es intercambiable a fin de poder ajustar el tamaño de partícula según el requerimiento de producción, su grado mínimo es de hasta 100  $\mu\text{m}$ .

- **Por fricción:** consiste en una cámara horizontal rotatoria que se llena con las partículas que se desean moler.
- **Por cuchillos:** consiste en un conjunto giratorio de cuchillas, tales como cutters, molinos de cuchillos, molinos guillotina, que cortan las partículas grandes reduciéndolas a tamaño predeterminado.
- **Por presión directa:** una partícula es atrapada y aplastada entre dos superficies duras, hasta un grado mínimo es de hasta 800  $\mu\text{m}$ .
- **Fraccionamiento, obtención de fracciones de almidón y proteínas:** el proceso de fraccionamiento se basa en la separación de diferentes tamaños de partícula.

La fibra alimentaria de legumbres es un subproducto (que se descarta en las primeras etapas) del proceso por el cual se obtienen los aislados o concentrados proteicos y el almidón.

El fraccionamiento puede realizarse por el método seco o el húmedo.

- **Método húmedo:** primero se remueve la cáscara de las semillas y luego se muelen para obtener una harina de las características correspondientes.

La harina de legumbre se pone en contacto con un agente acuoso de descomposición, tal como solución alcalina, a fin de separar las proteínas hidrosolubles, las cuales se secan y pueden a partir de allí aislarse u obtener diversas fracciones.

La matriz sólida (la fracción que no se solubiliza en agua) es tamizada a través de una serie de cribas a fin de recuperar el almidón. Tal como la fibra, el almidón es usualmente obtenido como producto secundario de la extracción y aislación de las proteínas de legumbres.

El aislado proteico obtenido mediante fraccionamiento por vía húmeda presenta un contenido de proteínas de hasta 88 %, mientras que la fracción de almidón refinado contiene un porcentaje mínimo de proteínas de 1 %. El principal inconveniente de este método es la pérdida de proteína y almidón durante los sucesivos lavados, así como el costo elevado de la recuperación y tratamiento de los efluentes.

- **Método seco:** este método abarca una primera etapa de molienda seca en molinos de impacto o de púas, hasta obtener una harina con granulometría menor a 60  $\mu\text{m}$ .

Seguido a esto se realiza la etapa de fraccionamiento propiamente dicha, la cual se lleva a cabo por un sistema de torres fluidizadas, donde las partículas están bajo vacío. El fundamento de la separación es por diferencia de tamaño de partícula: el almidón concentrado tiene una granulometría de 20 a 40  $\mu\text{m}$ , mientras que la proteína en general se encuentra en el rango de 2 a 20  $\mu\text{m}$ . De esta forma las partículas más pequeñas se separan porque fluyen más fácilmente en la torre, mientras que las de mayor tamaño quedan retenidas.

A continuación, se detallan procedimientos generales especiales que se mencionaron en **Tabla 2 y Tabla 3**.

**Escaldado:** consiste en someter a las arvejas seleccionadas a un tratamiento con vapor de agua a 95°C durante unos minutos, para inhibir la actividad enzimática y la flora microbiana presente.

**Congelación:** las arvejas escaldadas (detallado en el paso anterior) pasan por un túnel de aire con una temperatura de -18°C.

Por último, las arvejas se envasan según especificaciones del CAA y del cliente. Las arvejas envasadas son almacenadas, transportadas y conservadas en freezer de venta al público; todos estos eslabones de producción deben estar acondicionados para mantener la cadena de frío. De esta manera se evita daño en la estructura vegetal, se mantiene la inocuidad y la calidad nutritiva del alimento.

**Esterilización comercial:** las arvejas que fueron escaldadas y envasadas en recipiente de hojalata o tetra pack, se le añade líquido de cobertura, se extrae el aire, se cierra el envase y se someten a esterilización comercial. Esta consiste en un calentamiento a 121°C durante unos minutos para garantizar la inocuidad del producto final. Estos productos se almacenarán a temperatura ambiente, en lugar fresco y seco durante años.

## **1.6. Importancia de la determinación del contenido de almidón de arveja**

Actualmente, en nuestro país la cadena agroindustrial de legumbres se compone de diversos actores, el productor agrícola, la industria alimenticia y otros organismos entre los que podemos mencionar las Universidades, el INTA, el Instituto Nacional de Tecnología Industrial



(INTI), etc. Estos organismos de investigación estudian las problemáticas de los sectores de producción e industrialización y les ofrecen soluciones a eventuales problemas.

El INTA trabaja en diferentes aspectos como el mejoramiento genético, la conservación, caracterización y mejoramiento de distintas legumbres, entre ellas las arvejas, para su utilización como granos o a partir de sus componentes como ingredientes en la elaboración de nuevos alimentos. Por ello, podemos decir que se trabaja en la producción de materias primas con características específicas para su uso, de allí la importancia de contar con técnicas de laboratorio que determinen con precisión los componentes de los granos cultivados en el país.

En el Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Agua (LCASyA) de la EEA INTA Pergamino, en virtud de la demanda de los proyectos de investigación INTA; se trabajó en la implementación de una metodología para la determinación de almidón en arveja, dado que no se disponía de una técnica específica para ello. Por otro lado, cabe destacar que se consultó con otros laboratorios del país y se concluyó que no se realizaba esta metodología.

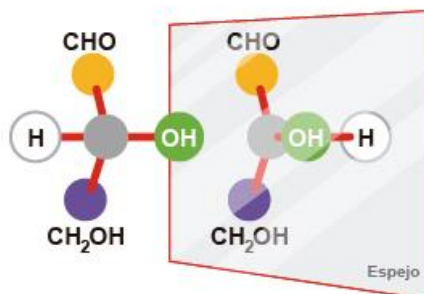
### **1.7. Técnicas de cuantificación del almidón de arveja**

Conocer la composición de las materias primas es de sumo interés para el sector agroalimentario, por ello la importancia de utilizar técnicas de cuantificación precisas para lograr productos terminados de la mejor calidad nutricional.

La valoración del contenido total de almidón en diversas matrices puede realizarse mediante diferentes métodos de laboratorio. Entre ellos, los métodos colorimétricos, (ejemplo, método de antrona/ácido sulfúrico, método de Dubois) métodos enzimáticos y métodos físicos (ejemplo, polarimetría), según BeMiller (2003). Todos los métodos mencionados presentan ventajas y desventajas comparativas que deben ser tenidas en cuenta al implementar una metodología analítica en un laboratorio.

La técnica de cuantificación de almidón por polarimetría se basa en las propiedades que poseen ciertas sustancias llamadas quirales (compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, en estado sólido, líquidos y en soluciones) de provocar la rotación del plano de polarización de una radiación. Una molécula es quiral cuando esta no puede superponerse a su imagen especular (**Figura 10**). La polarización de la luz permite que esta vibre en un solo plano y pueda registrarse. Si hacemos pasar luz polarizada por una solución de una sustancia

quiral, esta girará el plano de la luz polarizada y dicha rotación expresará la actividad óptica del compuesto en estudio.



**Figura 10.** Quiralidad. Fuente BeMiller (2003).

Basándonos en esta propiedad de los carbohidratos, la polarimetría puede ser utilizada en la industria agroalimentaria para la cuantificación de sacarosa en la industria azucarera, de lactosa en la industria láctea y del almidón tras su hidrólisis a glucosa en la industria de cereales, legumbres, etc.

Por lo tanto, un compuesto es considerado ópticamente activo si la luz linealmente polarizada sufre una rotación cuando pasa a través de una muestra de dicho compuesto. El ángulo de rotación del plano de polarización de la luz ( $\alpha$ ) depende de la naturaleza y concentración de la sustancia ópticamente activa de que se trate, la longitud de onda de la radiación, la longitud del tubo que contiene la muestra y la temperatura de trabajo.

Las ecuaciones que relacionan el ángulo de rotación ( $\alpha$ ) del plano de vibración de la luz linealmente polarizada, con la naturaleza y geometría del sistema ópticamente activo atravesado, se conocen como Leyes de Biot. Estas leyes son cuatro, la primera se usa para sólidos ópticamente activos; la segunda para líquidos puros; la tercera para soluciones de solutos ópticamente activos y la última para situaciones en las que existe en la muestra más de un componente ópticamente activo, de distinta naturaleza química (por ejemplo, un soluto ópticamente activo disuelto en un solvente que también es ópticamente activo o una mezcla de solutos ópticamente activos en un solvente inactivo).

Para la determinación del contenido de almidón en arveja por polarimetría se utiliza la tercera ley:  $\alpha = [\alpha] \cdot l \cdot c$

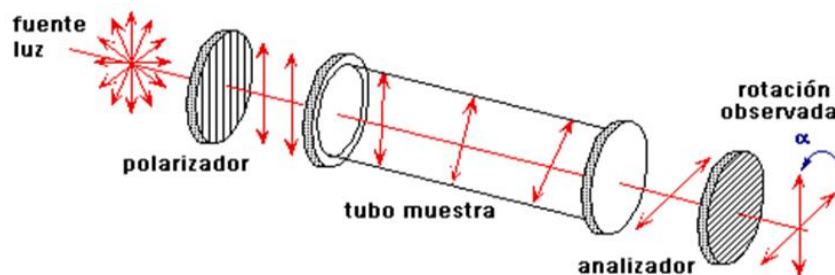
Siendo:

$\alpha$  = ángulo de rotación del plano de polarización de la luz, se mide en grados sexagesimales.

$l$  = longitud del tubo que contiene la muestra, se mide en mm para sólidos o en dm para líquidos.

$c$  = concentración, se expresa en gramos por mililitro o en molaridad.

$[\alpha]$  = poder rotatorio específico de una sustancia, se expresa en  $[\text{°} \cdot \text{mm}^{-1}]$  para sólidos y para líquidos puros o soluciones, la unidad es  $[\text{°} \cdot \text{ml} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$ . Es una constante física propia de las sustancias ópticamente activas y está definido para una longitud de onda ( $\lambda$ ) y una temperatura ( $T$ ) determinadas, el solvente empleado, la aplicación de campos eléctricos o magnéticos a la muestra y la aplicación de esfuerzos mecánicos. Esta rotación específica de la muestra  $[\alpha]$  se define como el ángulo de rotación del plano de polarización ( $\alpha$ ) que experimenta la luz al atravesar un tubo de longitud  $l$  decímetros que contiene una solución de concentración  $c$  (g/100ml) (**Figura 11**) (BeMiller, 2003; Pickering, 1980).



**Figura 11.** Rotación de la luz polarizada por una sustancia ópticamente activa. Fuente BeMiller (2003) y Pickering (1980).

## 1.8. Validación metodológica

La validación consiste en confirmar y documentar que los resultados de la aplicación de un método de análisis son confiables. Este proceso resulta fundamental para el control de calidad e inocuidad de los alimentos.

Todo método nuevo o modificado debe validarse previamente para poder introducirlo a la rutina y tener la seguridad de que los resultados emitidos serán los correctos, permite a los analistas demostrar que el método es adecuado para su propósito.

En la validación de un método está implícito que los equipos se utilizan según las especificaciones del fabricante, con funcionamiento y calibración correcta. Además, el operador que realiza los estudios debe estar capacitado para ese tipo de trabajo, con el fin de que sea capaz de tomar decisiones idóneas.

### **1.9. Criterios de validación. Definiciones**

Los requisitos o criterios de validación que debe cumplir un método analítico y que deben ser determinados en el procedimiento de validación son los siguientes:

#### **1) Exactitud (Veracidad o Justeza y Precisión)**

#### **2) Selectividad**

#### **3) Linealidad**

#### **4) Sensibilidad de calibrado**

#### **5) Límite de detección y límite de cuantificación**

#### **6) Robustez**

- 1) La **exactitud** es la cercanía del valor analítico al "valor verdadero" de concentración del compuesto de interés en el material bajo examen. Es la concordancia entre la mejor estimación de una cantidad y su valor real.

La exactitud puede estudiarse en dos componentes: la veracidad y la precisión. De hecho, la exactitud es un concepto cualitativo y no es posible medirlo sino a través de los componentes mencionados.

La **veracidad o justeza** de un método es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto de un valor real, se evalúa mediante el sesgo. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores que deberían corregirse.

La veracidad puede ser determinada calculando el sesgo o el porcentaje de recuperación de la cantidad del analito presente en la muestra.

Para determinar el sesgo debe utilizarse material de referencia o material de ensayo de aptitud.

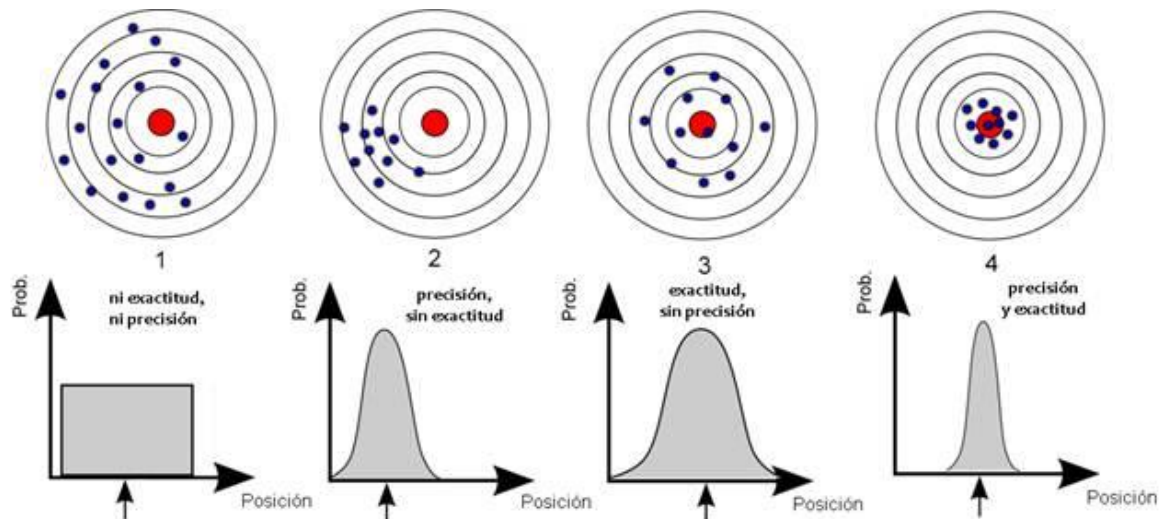
El porcentaje de recuperación consiste en fortificar la muestra antes del análisis, realizar el proceso analítico en muestras fortificada y sin fortificar, luego se realiza el cálculo de la diferencia de los valores obtenidos analíticamente. Este valor permite conocer la eficiencia del método para cuantificar el analito en estudio.

La **precisión** se determina haciendo ensayos repetitivos de una misma muestra, o de cada conjunto de muestras (siendo muy importante la homogeneidad del sustrato). La precisión se evalúa en dos niveles: la repetibilidad y la reproducibilidad.

La **repetibilidad** es la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (un solo operador, el mismo equipo, los mismos reactivos, el mismo día, etc.). Se lleva a cabo sobre la base de un número suficiente de determinaciones de una mezcla homogénea del producto. Los ensayos en este contexto, son los análisis independientes de muestras que han pasado por todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta los resultados de las pruebas finales. La repetibilidad describe la variabilidad mínima del proceso analítico.

La **reproducibilidad** es la precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones (en diferentes días, por diferentes personas, empleando reactivos preparados de diferentes lotes, etc.). La reproducibilidad describe la máxima variabilidad de un procedimiento analítico.

La precisión se calcula matemáticamente a través del coeficiente de variación (CV) o también llamado variabilidad. Un método será más preciso, en tanto menor coeficiente de variación se obtenga, es decir, cuanto más se acerquen entre sí los resultados obtenidos de varios análisis realizados a una misma muestra. Rivero (2013) utiliza la **Figura 12** para graficar las posibles situaciones que pueden existir al comparar exactitud y precisión de un método analítico. El caso uno grafica un método de escasa exactitud y escasa precisión, el caso dos un método de buena precisión y escasa exactitud, el caso tres un método de buena exactitud y escasa precisión, el caso cuatro un método de buena exactitud y buena precisión.



**Figura 12.** Comparación de la exactitud y la precisión de un método analítico. Fuente Rivero (2013).

- 2) La **selectividad o especificidad** se define como la habilidad de un método para responder exclusivamente a la sustancia que se desea analizar.
- 3) **Linealidad** es la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta del método en un intervalo o rango de concentraciones.
- 4) La **sensibilidad de calibrado** se define como el coeficiente diferencial entre la señal medida (respuesta del método) y la concentración del analito.

En el caso de una calibración lineal, la sensibilidad de calibrado coincide con la pendiente de la recta de calibración, e indica la capacidad de respuesta del método analítico a pequeñas variaciones de la concentración del analito.

5) **Límite de detección y límite de cuantificación.**

El límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Es variable cualitativa.

El límite de cuantificación es la menor concentración o cantidad de analito que puede ser cuantificada con aceptable precisión y exactitud. Es variable cuantitativa.

- 6) **Robustez** es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona

una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. Los factores de influencia pueden ser cuantitativos (pH, temperatura, porcentaje de componente orgánico en una fase móvil, etc.) como cualitativos (fabricante de una columna, de un reactivo, etc.) (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010; Vinagre, 1995).

### **1.10. Antecedentes**

Comba y Beltrán (2012) realizaron estudios comparativos sobre metodologías de cuantificación de almidón en maíz, concluyendo que las técnicas de cuantificación de almidón por digestión enzimática son costosas y menos precisas que las técnicas polarimétricas.

Organismos de referencia como es el caso de la Unión Europea, utilizan métodos polarimétricos para cuantificar almidón en diversas matrices (Unión Europea, 2017).

Un trabajo de tesis realizado en el LCASyA de la EEA Pergamino, comparó la cuantificación de almidón de maíz utilizando la técnica de Dubois y un método polarimétrico. Concluyó que el último método mencionado posee coeficientes de variación, repetibilidad y reproducibilidad menores que el método colorimétrico de Dubois (Dinatale, 2018).

### **1.11. Hipótesis**

La aplicación de la técnica polarimétrica planteada por la Norma ISO 10520:1997 a la determinación de almidón en arveja producirá resultados aceptables en los términos analíticos del laboratorio.

## **2. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS**

### **2.1. Objetivo general**

El objetivo de este trabajo es poner a punto una metodología para determinar el contenido de almidón en arveja por polarimetría.

### **2.2. Objetivos específicos**

Determinar la repetibilidad del método para evaluar la mínima variabilidad del procedimiento analítico.

Determinar la reproducibilidad del método para evaluar la máxima variabilidad del procedimiento analítico.

Determinar el porcentaje de recuperación para evaluar la veracidad del método en estudio.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material utilizado**

Para todas las determinaciones realizadas en este experimento se utilizó el híbrido comercial de arveja “Viper”, cosechado en la EEA Pergamino en estado de madurez fisiológica.

#### **3.2. Metodología**

Se utilizó la técnica de “Almidones y féculas nativos. Determinación del contenido de almidón, Método polarimétrico de Ewers” (ISO 10520, 1997).

##### **3.2.1. Campo de aplicación**

Esta norma internacional especifica un método polarimétrico para la cuantificación del contenido de almidón nativo, a excepción del almidón con alto contenido de amilosa. No es aplicable al almidón modificado o pregelatinizado (soluble en agua).

##### **3.2.2. Fundamento del método**

El método incluye dos determinaciones:

**3.2.2.1** Una porción de la muestra se trata con ácido clorhídrico diluido. Tras clarificación y filtración se mide la rotación óptica de la solución por polarimetría.

**3.2.2.2.** Una segunda porción de la muestra se trata con etanol al 40% v/v para extraer azúcares solubles y polisacáridos de menor masa molecular. A continuación, el filtrado se somete al procedimiento indicado en 3.2.2.1.

La diferencia entre las medidas 3.2.2.1. y 3.2.2.2., multiplicada por un factor, da el contenido de almidón de la muestra.

Los parámetros claves del método son el tiempo y la temperatura de la hidrólisis, y el correcto uso y calibración del polarímetro. Además, es muy importante la agitación constante en el baño de agua.

### 3.2.3. Instrumental y elementos de laboratorio

- Baño de agua, mantenido a 100°C, que debe ser de un tamaño adecuado para asegurar un rápido aumento de temperatura y condiciones estables de la misma al sumergir los matraces durante la hidrólisis.
- Embudos, vasos de precipitados, espátulas, cápsulas para humedad, tubos de centrifuga.
- Papel de filtro de velocidad lenta.
- Erlenmeyer de 250 ml con junta esmerilada estándar y refrigerante de reflujo.
- Matraces aforados de 100 ml.
- Molino que permita efectuar una molienda hasta un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm.
- Tamiz 0,5 mm.
- Polarímetro automático ATAGO AP300 utilizado para este trabajo (**Figura 13**).
- Polarímetro con un tubo de 200 mm y escala graduada al 0,05° (**Figura 14**).
- Balanza analítica con una exactitud de 0,0001g.
- Centrifuga DU PONT SORVALL GLC-2B (**Figura 15**).



**Figura 13.** Polarímetro automático ATAGO AP300. Fuente Propia.



**Figura 14.** Tubo de polarímetro de 200mm. Fuente Propia.



**Figura 15.** Centrifuga DU PONT SORVALL GLC-2B. Fuente Propia.

### 3.2.4. Drogas y Reactivos

- **Agua destilada para análisis (p.a.)**
- **Ácido clorhídrico diluido, (HCl) = 7,7 M (mol/l)**  
Diluir 63,7 ml de ácido clorhídrico (densidad = 1,19 g/ml) con agua destilada hasta 100 ml.
- **Ácido clorhídrico diluido, (HCl) = 0,309 M (mol/l)**  
Diluir 25,6 ml de ácido clorhídrico (densidad = 1,19 g/ml) con agua destilada hasta 1000 ml.  
Nota: La concentración debe verificarse con una solución de hidróxido de sodio [(NaOH) = 0,1 mol/l] y rojo de metilo como indicador: 10 ml de HCl deben consumir 30,94 ml de 0,1 mol/l de NaOH.
- **Solución de Carrez I:** disolver 10,6 g de hexacianoferrato (II) de potasio trihidrato [K<sub>4</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>]. 3H<sub>2</sub>O] en agua. Diluir a 100 ml con agua destilada.
- **Solución de Carrez II:** disolver 21,9 g de acetato de zinc dihidrato [Zn (CH<sub>3</sub> COO)<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O] y 3 g de ácido acético glacial en agua destilada. Diluir a 100 ml con agua destilada.
- **Etanol, solución al 40 % v/v,** con una densidad de 0,948 g/ml a 20°C.

### 3.2.5. Preparación de la muestra

#### 3.2.5.1. Molienda

Las muestras de arveja se limpiaron para eliminar materiales extraños y granos rotos, luego fueron molidas utilizando un molino a cuchillas planas refrigerado *HQ Analyzer MC-II*, hasta un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm.

### 3.2.6. Procedimientos analíticos

#### 3.2.6.1. Determinación de humedad

Se determinó el contenido de humedad de las muestras con la finalidad de informar el contenido de almidón en base seca. Para ello se utilizó el método de referencia AACC (1995).

Se utilizaron cápsulas de aluminio que fueron previamente numeradas y mantenidas en estufa durante una hora a 105°C, luego fueron enfriadas colocándolas en un desecador con silica gel durante aproximadamente 20 minutos.

Cada cápsula numerada se pesó en una balanza analítica, luego se pesaron aproximadamente 2g de la muestra a analizar con una exactitud de 0,0001g. Posteriormente fueron llevadas a estufa a 105°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo de secado, las muestras se retiraron de la estufa y se colocaron en el mismo desecador con silica gel donde se enfriaron por 20 minutos y finalmente, se pesaron en la misma balanza.

El porcentaje de humedad fue determinado mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(M - m)}{M} \times 100$$

Siendo:

M = masa inicial de la muestra en gramos.

m = masa de la muestra seca en gramos.

### **3.2.6.2. Determinación de almidón por la técnica de Almidones y féculas nativos. Determinación del contenido de almidón, Método polarimétrico de Ewers.**

#### **3.2.6.2.1. Determinación del poder rotatorio total (P)**

##### **Hidrólisis**

Se pesaron 2,5 g ± 0,001 g de la muestra molida y tamizada, se pasaron a un matraz aforado de 100 ml, se agregaron 25 ml de solución de ácido clorhídrico 0,309 M, se agitó bien hasta que la muestra se haya impregnado con la solución para evitar la formación de grumos, y se añadieron otros 25 ml de la misma solución de ácido clorhídrico 0,309 M, arrastrando hacia el fondo la totalidad de la muestra.

Se sumergió el matraz en un baño de agua a 100°C y se giró varias veces durante los primeros tres minutos para evitar que se formen grumos y unificar la temperatura de la solución, sin sacar el matraz del baño. Luego se continuó agitando cada 5 minutos hasta completar un tiempo total de hidrólisis de 15 minutos.

### **Clarificación**

Se retiró el matraz del baño, se agregaron de inmediato 30 ml de agua fría y se enfrió la solución hasta  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se agregó un volumen de 5 ml de solución de Carrez I y se agitó durante 30 segundos aproximadamente. Luego se añadieron 5 ml de solución de Carrez II y se agitó durante 30 segundos.

Se llevó a volumen de enrase con agua destilada homogeneizando la solución y se procedió al centrifugado a una velocidad de 5000 rpm durante 10 minutos.

### **Determinación del poder rotatorio**

Se determinó el poder rotatorio de la solución (P) con el polarímetro según las indicaciones del fabricante.

### **3.2.6.2.2. Determinación de la rotación óptica (P') de sustancias solubles en etanol al 40 % v/v**

#### **Solubilización de la muestra**

Se pesaron  $5,0 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  de la muestra molida y tamizada, se pasaron a un matraz aforado de 100 ml, se agregaron 80 ml de etanol al 40 % v/v y se dejó la mezcla a temperatura ambiente, con agitación cada 10 minutos durante una hora. Transcurrido ese tiempo se enrasó con etanol al 40 % v/v, se homogenizó invirtiendo el matraz como mínimo 10 veces, se transfirió la solución a tubos de centrifuga y se centrifugó a una velocidad de 5000 rpm durante 10 minutos.

#### **Hidrólisis**

En un erlenmeyer de 250 ml se colocaron 50 ml del sobrenadante anterior y se agregaron 2,1 ml de solución de ácido clorhídrico 7,7 M, se agitó fuertemente 15 segundos. Se ajustó un refrigerante de reflujo al erlenmeyer y se sumergió en el baño de agua a  $100^{\circ}\text{C}$ . Durante los primeros 3 minutos para evitar que se formen grumos y unificar la temperatura de la solución, sin sacar el matraz del baño. Luego seguir agitando cada 5 minutos hasta completar un tiempo total de hidrólisis de 15 minutos.

### **Clarificación**

Se retiró el erlenmeyer del baño, se transvasó su contenido a un matraz aforado de 100 ml, se agregaron de inmediato 30 ml de agua fría y se enfrió la solución hasta  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Luego

se agregó un volumen de 5 ml de solución de Carrez I y se agitó durante 30 segundos. Luego se añadieron 5 ml de solución de Carrez II y se agitó durante 30 segundos aproximadamente.

Se llevó a volumen de enrase con agua destilada homogeneizando la solución y se procedió al centrifugado a una velocidad de 5000 rpm durante 10 minutos.

### Determinación del poder rotatorio

Se determinó el poder rotatorio de la solución ( $P'$ ) con el polarímetro según las indicaciones del fabricante.

### 3.2.7. Cálculos y expresión de los resultados

Se calculó el contenido de almidón, en gramos por 100 g de muestra, con la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de almidón} = \frac{2000 (P - P')}{[\alpha]_{T=20,0^{\circ}\text{C}; \lambda=589 \text{ nm}}}$$

Siendo:

$P$ =rotación óptica total en grados de ángulo.

$P'$ =rotación óptica en grados de ángulo de las sustancias solubles en etanol al 40 % v/v.

2000 = es un factor de concentración.

$[\alpha]_{T=20,0^{\circ}\text{C}; \lambda=589 \text{ nm}}$  = la rotación específica del almidón, cuyos valores se indican en la **Tabla 6** para los diferentes orígenes, en grados de ángulo. En este trabajo se utilizó el valor de 184,0.

**Tabla 6.** Rotación específica de almidón de diferentes orígenes, determinada según método utilizado. Fuente ISO 10520 (1997).

Almidón de	Rotación específica
Trigo	182,7
Avena	181,3
Centeno	184,0
Cebada	181,5
Maíz	184,6
Arroz	185,9
Otros almidones y mezclas de almidones en alimentos compuestos	184,0

### **3.3. Puesta en marcha de la metodología en el LCASyA**

#### **3.3.1. Acondicionamiento**

Para la puesta en marcha de esta metodología fue necesario el acondicionamiento de los elementos e instrumental del laboratorio, la preparación de los reactivos, la preparación de las planillas de trabajo, y se protocolizó cómo realizar una adecuada eliminación de los residuos.

#### **3.3.2. Ejecución del método**

En esta etapa se ejecutó la técnica reiterada veces con el objetivo de comprobar si la metodología era realizable. Es decir, si los resultados obtenidos coincidían con datos bibliográficos.

#### **3.3.3. Verificación del método**

Por tratarse de un método polarimétrico normalizado se procedió a verificar la calidad de los resultados, para ello se evaluó la exactitud del método. Se estudió la exactitud del método en sus dos componentes: la precisión y la veracidad.

La precisión se evaluó mediante la repetibilidad y reproducibilidad.

##### **3.3.3.1. Determinación de la repetibilidad**

Para evaluar la repetibilidad del método se realizaron diez determinaciones de una misma muestra (material de estudio), en el mismo día, por el mismo analista, se utilizó el mismo equipamiento y se mantuvieron iguales las condiciones ambientales y de operación. La repetibilidad se calculó utilizando el coeficiente de variación.

##### **3.3.3.2. Determinación de la reproducibilidad**

Para evaluar la reproducibilidad del método se realizaron diez determinaciones de la misma muestra (material de estudio) en diferentes días, diferentes analistas y diferentes reactivos. Se utilizó el mismo equipamiento y se mantuvieron iguales las condiciones ambientales y de operación. Para determinar la reproducibilidad se calculó el coeficiente de variación.

##### **3.3.3.3. Determinación de la veracidad**

La veracidad es la concordancia entre un valor promedio de determinaciones realizadas y el valor teórico, se evaluó mediante el método de adición de patrón (Álvarez, 2007). Se expresa como porcentaje de recuperación.

Para realizar el método adición de patrón se procede de la siguiente manera:

- Se añade cantidad conocida del analito a la matriz en estudio.
- Se realiza procedimiento analítico y después se realiza un cálculo del cociente entre el valor medido y el valor real, finalmente se refiere en porcentaje.

Para realizar el análisis de recuperación se procedió de la siguiente manera: conociendo el % de almidón que contiene la matriz en estudio (arveja Viper) se le añadió una cantidad correspondiente al 5 % de almidón puro de arveja.

Luego se realizó el método según se explica en el apartado 3.2.6.2 y se calculó el porcentaje de recuperación, utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Fórmula de recuperación: } R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} * 100$$

$R$ : es el porcentaje de recuperación.

$\bar{X}$ : es el valor promedio de las determinaciones realizadas.

$\hat{X}$ : es el valor teórico o calculado de almidón.

Para evaluar el comportamiento del método en estudio respecto al porcentaje de recuperación obtenido, se aplicó una prueba t de Student para comparación de pares de medidas, utilizando el método de adición de patrón al 5 % para n= 6.

Para calcular el t de Student necesitamos el t calculado y t crítico.

t crítico se obtiene de tablas y el t calculado se obtiene según fórmula siguiente:

$$t_{calc} = \frac{[100 - \%R]}{S * \sqrt{n}}$$

Donde:

$t_{calc}$  = t observado o calculado.

% R = % Recuperación.

X= Promedio de valores leídos.

S= Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación.

n= Número de lecturas.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Puesta en marcha de la metodología

A partir de ejecutar reiteradamente la técnica, para determinar el contenido de almidón en ocho muestras ajustando las actividades a dos jornadas laborales, se optó por la rutina de trabajo que a continuación se detalla:

Día uno: se muelen las muestras, se tamizan, se pesan y se colocan en los matraces correspondientes.

Día dos: en el caso de la determinación de las sustancias solubles en etanol al 40 % v/v, se realiza la solubilización de la muestra y se centrifuga para obtener un volumen de sobrenadante de 50 ml. Posteriormente se llevan a hidrolisis todos los matraces, aquellos donde se determinará el poder rotario de las sustancias solubles en etanol al 40 % v/v y los matraces donde se determinará el poder rotatorio total. Luego de la clarificación se centrifugan y filtran las soluciones. Por último, se realizan las lecturas del poder rotatorio de las soluciones en el polarímetro y se efectúan los cálculos.

El protocolo de limpieza y descarte de desecho de los análisis se detallan a continuación:

La recolección y destino final de los desechos peligrosos producidos en el LCASyA se encuentra a cargo de una empresa contratista del traslado de residuos y disposición final.

- **Procedimiento para la eliminación de desechos sólidos.**

Se procede a la remoción de sedimentos sólidos de los tubos de centrifuga y matraces utilizando una espátula. Estos desechos son descartados en recipientes con bolsas especiales precintadas debidamente rotulados "Sólidos" provistos por la empresa contratada.

- **Procedimiento para la eliminación de desechos líquidos.**

1. Se procede al descarte de los líquidos sobrantes contenidos en matraces, tubos de centrifuga y vasos de precipitados. Los desechos son descartados en recipientes estancos debidamente rotulados como "Líquidos ácidos" provistos por la empresa contratada.
2. Luego se procede a un enjuague de los matraces, tubos de centrífuga y vasos de precipitados con agua de la canilla y se descarta este primer enjuague en el recipiente rotulado "Líquidos ácidos".
3. Posteriormente se realiza un lavado de los matraces, tubos de centrífuga y vasos de precipitados con agua jabonosa, con ayuda de cepillos y sonicador. Luego se realiza

un enjuague con agua de la canilla y se descarta en el desagüe domiciliario del laboratorio.

4. Se realiza un último enjuague con agua destilada descartando el líquido en el desagüe domiciliario del laboratorio.
5. Se colocan los recipientes lavados en gradillas correspondientes y se lleva a estufa con una temperatura de 30°C para su secado.

## 4.2. Verificación del método polimérico

### 4.2.1. Resultados de la prueba de repetibilidad

En la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de repetibilidad.

**Tabla 7.** Ensayos involucrados en el análisis de repetibilidad.

<b>Muestra</b>	<b>% Almidón (BS)</b>
Ensayo 1	48,62
Ensayo 2	49,11
Ensayo 3	50,21
Ensayo 4	48,87
Ensayo 5	49,85
Ensayo 6	49,36
Ensayo 7	50,21
Ensayo 8	50,21
Ensayo 9	49,97
Ensayo 10	49,11
<b>Promedio</b>	<b>49,5530</b>
<b>Desvío estándar</b>	<b>0,6088</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,0123</b>

El coeficiente de variación (CV) fue de 0,0123%, este valor corresponde a la mínima variabilidad entre las determinaciones.

#### 4.2.2. Resultados de la prueba de reproducibilidad

En la **Tabla 8** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de reproducibilidad.

**Tabla 8.** Ensayos involucrados en el análisis de reproducibilidad.

<b>Muestra</b>	<b>% Almidón (BS)</b>
Ensayo 1	50,83
Ensayo 2	51,19
Ensayo 3	51,52
Ensayo 4	50,21
Ensayo 5	49,97
Ensayo 6	49,40
Ensayo 7	51,37
Ensayo 8	50,75
Ensayo 9	50,51
Ensayo 10	49,11
<b>Promedio</b>	<b>50,4862</b>
<b>Desvío estándar</b>	<b>0,8131</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,0161</b>

El coeficiente de variación (CV) fue de 0,0161%, este valor corresponde a la máxima variabilidad del procedimiento analítico.

#### 4.2.3. Resultados de la prueba de veracidad

En la **Tabla 9** se muestran los resultados del % de recuperación obtenidos para seis ensayos del método adición de patrón al 5 %. Por último, se realizó una prueba de t de Student para evaluar las diferencias estadísticas del método.

**Tabla 9.** Ensayos involucrados en el método de adición de patrón.

<b>Muestra</b>	<b>% Recuperación</b>
Ensayo 1	102,54
Ensayo 2	100,72
Ensayo 3	99,80
Ensayo 4	98,89
Ensayo 5	99,60
Ensayo 6	102,54
<b>Promedio (X)</b>	<b>100,68</b>
<b>Desvío estándar</b>	<b>1,55</b>
<b>n</b>	<b>6</b>

Para el cálculo de t de Student, el t crítico se obtuvo de tablas y para el t calculado se utilizó la fórmula siguiente:

$$t_{calc} = \frac{[100 - \%R]}{S * \sqrt{n}}$$

Con los datos obtenidos y de tabla se realizó una prueba t de Student.

Calculamos el t Student:

t calculado 0,179

t crítico 2,571

Para conocer si existen diferencias entre el valor de la experiencia analítica y el valor de referencia, se determinó el t calculado (0,179) el cual fue menor que el t crítico (2,571); por lo tanto, esto indica que no existieron diferencias significativas entre los valores de porcentaje de recuperación calculados y los obtenidos experimentalmente para el 95 % de confianza y 5 grados de libertad.

De este modo se concluye que, la metodología utilizada para la cuantificación de almidón en arveja, tiene una veracidad aceptable.

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del contenido de almidón en arveja por el método polarimétrico en estudio, son similares a ensayos bibliográficos realizados por el mismo método en diferentes variedades de arveja (Dagmar et al., 2017; Bastianelli et al., 1998; Racz, 1997).

Dinatale (2018) utilizó una metodología polarimétrica para la determinación del contenido de almidón en maíz para ser usado en programa de mejoramiento de ese cereal, este antecedente nos permite asumir que la metodología en estudio en esta tesina para determinar el contenido de almidón en arvejas puede ser usada en programas de mejoramiento de legumbres. Al comparar en los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad los CV respectivos que se obtuvieron fueron inferiores a los expresados en el trabajo antes mencionado como antecedente.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación por el método de adición de patrón, se utilizaron los procedimientos analíticos detallados por Vinagre (1995); los valores de porcentaje de recuperación calculados y obtenidos experimentalmente fueron aceptables significativamente.

## 6. CONCLUSIONES

La implementación de esta técnica polarimétrica le permitió al LCASyA acceder a una metodología de cuantificación del contenido de almidón en arveja que hasta el momento no existía.

En las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad los CV fueron valores esperados, por lo tanto, se dice que la variación del método entre las determinaciones es aceptable.

Trabajando con un nivel de confianza del 95 % y 5 grados de libertad, se ha podido corroborar la hipótesis, concluyendo que no existen diferencias significativas al probar la veracidad del método.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AACC, 44-16. (1995). *Approved Methods of the AACC*. 9th Edition, AACC. Inc.: St. Paul Minnesota.
- Alasino, M. (2009). Harina de arveja en la elaboración de pan. Estudio del efecto de emulsionantes como mejoradores de volumen y vida útil. Retrieved 09 19, 2020, from <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/145/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alimentos Argentinos. (2014). Legumbres, nutrición y educación, Ficha N° 31. Recuperado el 23 de 09 de 2020, de [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha\\_31\\_Legumbres.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_31_Legumbres.pdf)
- Álvarez, P. (2007). *Validación de métodos analíticos y control de calidad interno*. Pergamino, Argentina: INTA Pergamino.
- Al-Wesali, M., Lambert, N., Welham, T., & Domoney, C. (1995). The influence of pea seed trypsin inhibitors on the in vitro digestibility of casein. *J. Sci. Food Agric.* 68, 431-437.
- Ayet, G., Muzquiz, M., Burbano, C., Robredo, L., Cuadrado, C., & Price, K. (1996). Determinación de saponinas en las principales leguminosas cultivadas en España. *Food Sci. Technol. Int.* 2, 95-100.
- Basterra, L., Alos, M., & Morón, P. (2016). *Recetario, Hoy comemos... ¡Legumbres!* Retrieved 06 15, 2021, from [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/pdf/DAA\\_Recetario\\_de\\_Legumbres\\_2016.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/pdf/DAA_Recetario_de_Legumbres_2016.pdf)
- Bastianelli, D., Grosjean, F., Peyronnet, C., Duparque, M., & Regnier, J. (1998). Feeding value of pea (*Pisum sativum*, L.). Retrieved 02 10, 2021, from [https://www.researchgate.net/profile/Denis-Bastianelli/publication/231896818\\_Feeding\\_value\\_of\\_pea\\_Pisum\\_sativum\\_L\\_1\\_Chemical\\_composition\\_of\\_different\\_categories\\_of\\_pea/links/0a85e52f24f7fd831e000000/Feeding-value-of-pea-Pisum-sativum-L-1-Chemical-composit](https://www.researchgate.net/profile/Denis-Bastianelli/publication/231896818_Feeding_value_of_pea_Pisum_sativum_L_1_Chemical_composition_of_different_categories_of_pea/links/0a85e52f24f7fd831e000000/Feeding-value-of-pea-Pisum-sativum-L-1-Chemical-composit)
- Bazzano, L., Thompson, A., Tees, M., Nguyen, C., & Winham, D. (2011). Non-soy legume consumption lowers cholesterol levels: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21, 2, pp. 94-103.
- Belitz, H., & Grosh, W. (1997). *Química de los alimentos*. 2ª Ed. Editorial Acriba.
- BeMiller, J. N. (2003). El análisis de los hidratos de carbono. *Análisis de los Alimentos (Capítulo 10)*. 169-205. Zaragoza, España: Acriba S.A.
- Birk, Y. (1996). Protein proteinase inhibitors in legume seeds: Overview. *Arch. Latinoam. Nutr.* 44, 26S-30S.
- Bolsa de Comercio de Rosario. (2019). *Panorama del mercado nacional e internacional*. Recuperado el 23 de 09 de 2020, de <https://www.bcr.com.ar/es/print/pdf/node/73324>
- C.A.A. (2013). Capítulo XI, alimentos vegetales, artículo 877 - 878 (Resolución Conjunta SPRel N° 169/2013 y SAGyP N° 230/2013). Recuperado el 01 de 09 de 2020, de

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo\\_xi\\_vegetales\\_actualiz\\_2020-08.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_xi_vegetales_actualiz_2020-08.pdf)

- Carmona, A., Borgudd, L., Borges, G., & Levy-Benshimol, A. (1996). Effect of black bean tannins on in vitro carbohydrate digestion and absorption. *J. Nutr. Biochem.* 7, 445-450.
- Chablé Moreno, F. (2017). Germinación de semillas. Retrieved 04 07, 2021, from <https://fchableitroque.blogspot.com/2017/11/germinacion-de-semillas.html>
- Comba, N., & Beltrán, R. (2012). Comparación de técnicas analíticas de determinación de almidón de maíz. Recuperado el 01 de 09 de 2020, de [http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal\\_frvm/CyTAL\\_2012/TF/TF005.pdf](http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2012/TF/TF005.pdf)
- Dagmar , j., Rainer, M., Nadja, S., Klaus , S., & Pia Rosenfelder, K. (2017). Methodological impact of starch determination on starch content and ileal digestibility of starch in grain legumes for growing pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* doi:10.1186/s40104-016-0131-7
- Dinatale, N. (2018). Validación de un método polarimétrico para determinar almidón en maíz. Pergamino, Bs. As., Argentina. Recuperado el 23 de 09 de 2020, de <https://www.unnoba.edu.ar/wp-content/uploads/2019/04/resumen-DINATALE-NADIA.pdf>
- FAO. (2016a). FAO. Recuperado el 01 de 09 de 2020, de <http://www.fao.org/3/a-i5528s.pdf>
- FAO. (2016b). Legumbres, semillas nutritivas para un futuro sostenible. Retrieved 10 20, 2020, from <http://www.fao.org/3/i5528s/I5528S.pdf>
- Fuentes Zaragoza, E., Riquelme Navarrete, M., Sánchez Zapata, E., & PérezÁlvarez, J. (2010). Resistant starch as functional ingredient: A review. doi:10.1016/j.foodres.2010.02.004.
- Iciar Astiasarán , A., & Martínez, A. (2000). Alimentos Composición y Propiedades. Madrid, España: McGraw-Hill- Interamericana.
- IERAL de Fundación Mediterránea. (2011). Una Argentina Competitiva, Productiva y Federal. Cadena de legumbres. Recuperado el 23 de 09 de 2020, de [https://www.ieral.org/images\\_db/noticias\\_archivos/1798.pdf](https://www.ieral.org/images_db/noticias_archivos/1798.pdf)
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos. Guía técnica N° 1. Retrieved 09 02, 2020, from [https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia\\_tecnica\\_1\\_validacion\\_de\\_metodos.pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_metodos.pdf)
- ISO 10520. (1997). Almidones y féculas nativos. Determinación del contenido de almidón, Método polarimétrico de Ewers. Retrieved from <https://www.iso.org/standard/18589.html>
- Jansman, A., Enting, H., Verstegen, M., & Huisman, J. (1994). Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC2.4.21.1.) in digesta collected from the small intestine of pigs. *Br. J. Nutr.* 71, 627-641.

- Johnson, I., Gee, J., Price, K., Curl, C., & Fenwick, G. (1986). Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *J. Nutr.* 116, 2270-2277.
- Larralde, J., & Martínez, J. (1989). A reappraisal of the nutritional utilization of legumes. *Rev. Esp. Fisiol.* 45, 220-227.
- Licastro, F., Davis, L., & Morini, M. (1993). Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. *Int. J. Biochem.* 25, 845-852.
- Liener, I. (1996). Effects of processing on antinutritional factors in legumes: the soybean case. *Arch. Latinoam. Nutr.* 44, 48S-54S.
- Macarulla, M., Martínez, J., Barcina, Y., & Larralde, J. (1989). Intestinal absorption of D-galactose in the presence of extracts from *Phaseolus vulgaris* hulls. *Plant Foods Hum. Nutr.* 39, 359-367.
- Olmedilla, A., Alonso, B., Farré, R., Asensio, V., & Pedrosa, M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación. Retrieved 12 08, 2020, from [http://doi.org/10.1016/S1138-0322\(10\)70014-6](http://doi.org/10.1016/S1138-0322(10)70014-6)
- Osorio Díaz, P., Agama Acevedo, E., Mendoza Vinala, M., Tovar, J., & Bello Pérez, L. (2008). Pasta added with chickpea flour: Chemical composition, in vitro starch digestibility and predicted glycemic index. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6, 1, pp. 6–12.
- Parzanese, M. (2015). Tecnologías para la industria de alimentos. Procesamiento de legumbres: etapas poscosecha e industrialización. Retrieved 12 10, 2020, from [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_25\\_ProcesamientoLegumbres.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_25_ProcesamientoLegumbres.pdf)
- Pickering, W. (1980). *Química analítica moderna*. España: Reverté S.A.
- Prieto, G., Appella, C., Avila, F., Bracco, V., Brassesco, R., Buschittari, D., . . . Zgrablich, A. (2019). Rendimiento de cultivares de arveja (*Pisum sativum*, L) en diferentes ambientes de la República Argentina. Campaña 2018-2019. En INTA. INTA.
- Racz, V. J. (1997). Composición Nutricional de la Arveja forrajera. *Guía de la Industria Forrajera*. Canadá: Instituto Canadiense Internacional de Granos.
- Rivero, J. (2013). Validación Métodos Analíticos Cuantitativos, Cualitativos y SemiCuantitativos en el Laboratorio Clínico. Retrieved 02 07, 2021, from <https://es.slideshare.net/yerkob/validacion-metodos-analiticos>
- Rubio, L., Grant, G., Dewey, P., Bremmer, Y., & Pusztai, A. (1994). The intestinal true absorption of Zn in rats is adversely affected by diets containing a faba bean (*Vicia faba* L.) nonstarch polysaccharide fraction. *J. Nutr.* 124, 2204-2211.
- Sandberg, A. S. (2002). Bioavailability of minerals in legumes. *Br J Nutr.*, 88 (3), 281-285.
- Savage, G., & Deo, S. (1989). The nutritional value of peas (*Pisum sativum*). A literature Review. *Nutr. Abst. Review.* 59, 65-88.
- Savelkoul, F., Tamminga, S., Leenaars, P., Schering, J., & Ter Maat, D. (1994). The degradation of lectins, phaseolin and trypsin inhibitors during germination of white kidney beans, *Phaseolus vulgaris* L. *Plant. Foods Hum. Nutr.* 45, 213-222.



- Savelkoul, F., Van Der Poel, A., & Tamminga, S. (1992). The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A review. *Plant Foods Hum Nutr.* 42, 71-85.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2015). Leguminosas, el alimento de todos. Mexico. Retrieved 06 15, 2021, from <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/leguminosas-el-alimento-de-todos>
- Unión Europea. (2017). Orden de 16 de febrero de 2000 por la Métodos Oficiales de Análisis de Piensos o Alimentos para Animales y sus primeras materias. Recuperado el 23 de 09 de 2020, de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex%3A32009R0152>
- Vinagre, J. (1995). Calidad de métodos analíticos. Retrieved 11 25, 2020, from <http://www.fao.org/3/ah833s/AH833S15.htm>