

Determinación de amilosa en almidones mediante el método amperométrico.

Federico Benelli¹, Vicente Gianna^{1,2} y Edgardo Calandri^{1,2}

1. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – UNC
2. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos – FCEFyN – UNC

Fecha de recepción del manuscrito: 11/05/2018

Fecha de aceptación del manuscrito: 15/02/2019

Fecha de publicación: 29/03/2019

Resumen— El gránulo de almidón está constituido por dos macromoléculas: amilosa y amilopectina. En este trabajo se desarrolló una técnica para la cuantificación de la primera, basado en la formación del complejo amilosa/triioduro y la detección amperométrica de la cupla formada por este último y el ion yoduro. Se comprobó que, cuando el almidón fue disuelto en una solución acuosa de KOH 0,5 M a 50 – 60 °C, los resultados fueron imprecisos. El tiempo óptimo de disolución del almidón fue de 1 h, con tratamientos más prolongados no se obtuvieron mejores resultados. Se ensayaron varios métodos de ajuste para las curvas de titulación experimentales, siendo la sigmoidea la que brindó la mejor regresión. Para asistir al cálculo final se desarrolló un programa en lenguaje C#. Los resultados fueron promisorios, por ejemplo: para almidón de quínoa se obtuvo un valor de $13,7 \pm 0,5\%$, obteniéndose $13,3 \pm 1,5\%$ por el método enzimático de referencia; para el de arroz se obtuvo $20,7 \pm 0,4\%$, siendo el resultado por vía enzimática de 20%. Para maíz, mandioca y arroz se obtuvieron valores de 16,9%, 13,2% y 20,7%, resultados coherentes con los esperables según sus orígenes botánicos. El método resultó sencillo y fácil de instrumentar, no requiriendo de equipamiento complejo o de difícil adquisición, además todos los cálculos se pudieron automatizar mediante el software antes mencionado.

Palabras clave— Amperometría, Titulación, Amilosa, Iodo, Programación.

Abstract— The starch granule consists of two macromolecules: amylose and amylopectin. In this work a technique was developed for the quantification of the first, based on the formation of the amylose / triiodide complex and the amperometric detection of the couple formed by the latter and the iodide ion. It was found that when the starch was dissolved in an alkaline medium at 50 – 60 °C, the results were imprecise. The optimum time of dissolution of the starch was 1 h, with longer treatments no better results were obtained. Several methods of adjustment method were tested for the experimental titration curves, being the sigmoid one providing the best regression. To assist in the final calculation, a program was developed in C # language. The results were promising: the values obtained were close to those from the enzymatic method of reference, for example: for quinoa starch a value of $13.7 \pm 0.5\%$ was obtained, while the reference enzymatic method gave $13.3 \pm 1.5\%$; for rice, the value $20.7 \pm 0.4\%$ compares with the enzymatic giving 20%. For maize, cassava and rice, values of 16.9%, 13.2% and 20.7% were obtained, results consistent with those expected according to their botanical origins. The method is simple and easy to implement, not requiring complex equipments, in addition all calculations could be automated using the aforementioned software

Keywords— Amperometry, Tritation, Amilose, Iodine, Programming.

INTRODUCCIÓN

El almidón es la principal sustancia de reserva en cereales como el maíz, el trigo y el arroz; y en tubérculos como la papa, la batata y la mandioca. En los cereales y en pseudocereales, como la quínoa y el amaranto, pueden representar entre el 60 y 70% de los sólidos de esas semillas (Steffolani et al., 2013; Calandri, 2015). Se trata de una macromolécula compuesta por dos polisacáridos, amilosa y amilopectina, ambos constituidos por monómeros de glucosa, que se unen a través de enlaces glicosídicos α 1-4 (Dergal, 2006A). Los almidones provenientes de distintos orígenes botánicos se diferencian por la relación entre ambos polímeros naturales. La amilosa es un polímero

lineal que presenta una estructura helicoidal y puede llegar a estar constituida por entre 1000 y 10000 monómeros de glucosa (Copeland, 2009). La amilopectina, en cambio, posee una estructura ramificada que recuerda a un árbol y sus ramas (Calandri, 2015). En las harinas el almidón influye significativamente en propiedades como la absorción de agua, la viscosidad y el comportamiento reológico de productos como el pan, las pastas, los postres y muchos otros productos alimenticios que contienen harinas o almidones (Rosin et al., 2002; Lindeboom et al., 2005; Copeland et al., 2009). Al ser una molécula lineal y más pequeña, la amilosa es más soluble que la amilopectina y tiene a segregarse del gránulo y cristalizar (retrogrado) (Whistler y Daniel, 1993). Al ser más soluble es también más digerible por parte del tracto gastrointestinal, pero su tendencia a cristalizar la hace responsable de fenómenos no deseados, como el endurecimiento del pan (staling) (Dergal, 2006B). Tales fenómenos hacen necesario el conocer la proporción en la que se encuentra en el almidón (Copeland, 2009).

Dirección de contacto: Federico E. Benelli, Chacabuco 439, X5000 ALN.
Tel: 0351-153500802, fedebenelli@outlook.com

El procedimiento clásico para establecer el contenido de amilosa en almidones, por su solubilización diferencial en butanol, es tedioso y poco preciso (McCready y Hassid,

1943). Más recientemente el método de la concavalina A, si bien es más preciso, sigue resultando laborioso (Gibson *et al.*, 1997). Las técnicas quimiométricas requieren de una extensa parametrización a fin de alcanzar la precisión y exactitud requeridas (Kaufman *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011; Sené *et al.*, 1997). También se han utilizado otros procedimientos, como los basados en la calorimetría diferencial y en la separación por exclusión de tamaño (Zhu, 2012), o en la resonancia magnética (Tizzotti *et al.*, 2011), pero todos ellos requieren de una instrumentación no siempre accesible. El método aquí desarrollado es una mejora de aquel propuesto por Larson *et al.* (1953) y se asemeja al potenciométrico, propuesto por Duan *et al.* (2012), pero las curvas que se obtienen aquí son de más fácil tratamiento.

La amilosa presente en el almidón tiene la propiedad de formar un complejo de inclusión con triyoduro, el cual posee un intenso color azul (Séne, Thévenot y Prioul, 1997). Los iones yoduro y triyoduro forman una cupla redox, los primeros se oxidan en el ánodo, mientras el triyoduro se reduce en el cátodo, generando una corriente eléctrica medible y proporcional a los electrolitos en la solución.

El método aquí descrito se basa en la medición de la corriente generada por dicha cupla (Vincent y Ward, 1969).

En el presente trabajo se describe un método mejorado para la determinación de amilosa de diversos orígenes botánicos, mediante el método amperométrico. Se discuten tanto los aspectos experimentales de preparación y ejecución de la medida como así también, los detalles del programa desarrollado para una mejor determinación del punto final de la medición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Almidones

Se emplearon almidones de maíz, arroz y mandioca, adquiridos en comercios locales y almidón de quínoa, obtenido en la planta piloto del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA) de la FCEFyN. Los contenidos de amilosa para almidón de quínoa fueron medidos enzimáticamente con anterioridad (Cervilla *et al.*, 2015)

Reactivos

KOH en escamas, HCl concentrado y KI y KIO₃ sólidos; todos de calidad analítica.

Instrumentos

Para la titulación se utilizó una microbureta 5:0,01mL y un equipo que consta de un circuito como el que se presenta en la Fig. 1, provisto de un par de electrodos de platino y alimentado por una batería de 1,5V. Para las mediciones se utilizó un voltímetro el cual tiene una sensibilidad de 1 mV.

Titulación

Se pesan aproximadamente 35 mg de almidón, se colocan en un beaker de 100 mL y se agregan 10,0 mL de KOH 0,5 M, con agitación constante durante una hora, para solubilizar la amilosa presente en el almidón. A continuación, se agregan 5 mL de KI 0,5 M, 10,0 mL de HCl 1,0 M y 15,0 mL de agua destilada. Se comienza la titulación agregando 0,2 mL, del titulante, se esperan 30 segundos, se registra el voltaje y se continúa de ese modo

hasta haber adicionado 1 mL, luego se prosigue con adiciones de 0,15 mL hasta un volumen total de 3,1 mL.

Cálculos

La curva de voltaje vs volumen de titulante fue ajustada mediante una sigmoidea, utilizándose el método del error mínimo. El punto equivalente de la titulación se obtuvo hallando la intersección entre la recta tangente en el punto de inflexión de la sigmoidea y la recta de valor constante equivalente al promedio de las cuatro mediciones iniciales.

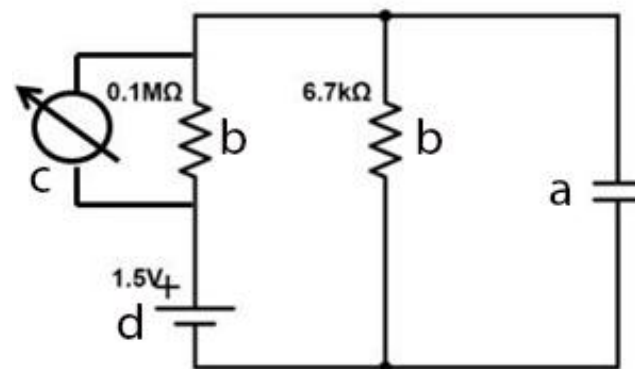


Fig. 1. Circuito utilizado. a. electrodos de medición. b. resistencias de valor fijo. c. milivoltímetro. d. fuente de corriente continua.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente determinación amperométrica el almidón se dispersa en condiciones alcalinas para solubilizar la amilosa, luego se acidifica y se agrega un exceso de yoduro, titulándose con yodato. El contacto de estos dos últimos reactivos libera triyoduro (Ec. 3) y, aunque I₂⁻ está en exceso, el triyoduro está inhibido de actuar en la cupla redox I₃⁻/I debido al complejo que forma con la amilosa (Fig. 2) y, en consecuencia, la corriente entre los electrodos permanecerá constante, mientras subsista esta situación. En cuanto toda la amilosa sea saturada con I₃⁻, este comenzará a exceder y se observará un incremento en la corriente entre electrodos.

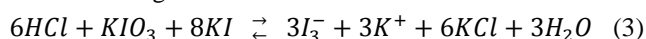
Reacción catódica:



Reacción anódica:



Ecuación general:



El circuito mostrado en la Fig. 1 aplica un potencial constante de 0,2 V entre los electrodos de platino, suficientemente bajo como para evitar la electrólisis, pero que permite la circulación de corriente cuando se establece una cupla redox entre dichos electrodos. La corriente que se genera es del orden del microamperio, magnitud que no es medible con precisión en un multímetro convencional. Por ese motivo se decidió medir la caída de tensión en una de las resistencias del circuito, como se indica en la Fig. 1. El valor medido supera los 1000 mV, medible con precisión suficiente en un multímetro convencional.

Un aspecto importante es la disolución de la amilosa. Esta molécula constituye el gránulo de almidón, en una estructura que recuerda a una cebolla y sus capas (Fig. 3).

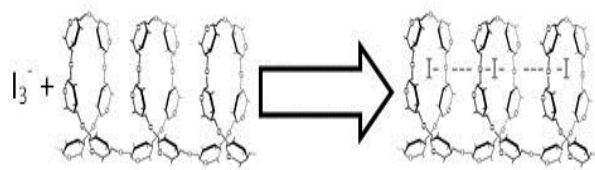


Fig. 2. Reacción entre triyoduro y amilosa.

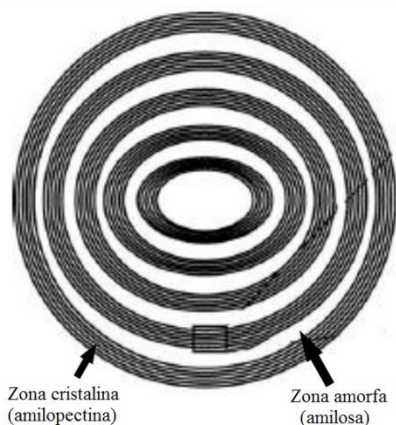


Fig. 3. Gránulo de almidón.

En una dispersión acuosa la amilosa, más pequeña que la amilopectina y de cadena lineal, tiende a escapar del gránulo para disolverse en el agua. Es fundamental que esto suceda, a fin de que el triyoduro entre en contacto y se acompleje con la amilosa, pero la disolución no es inmediata y resultó necesario, en una primera instancia, determinar el tiempo de contacto, previo al comienzo de la titulación. Como podemos ver en las Fig. 4, 5 y 6, a los 30 minutos de agitación la curva ascendente muestra poco ajuste en la regresión y una pendiente que es casi la mitad de la obtenida con una 1 hora de agitación. Entre 1 y 2 horas no se observan diferencias significativas que justifiquen prolongar el tratamiento, por lo tanto, 1 hora de agitación a temperatura ambiente resulta suficiente.

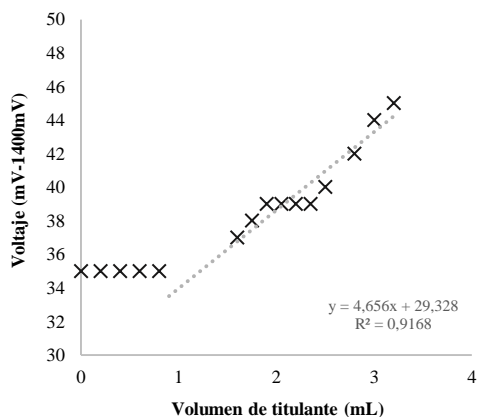


Fig. 4. Curva de titulación tras dilución de 30 minutos.

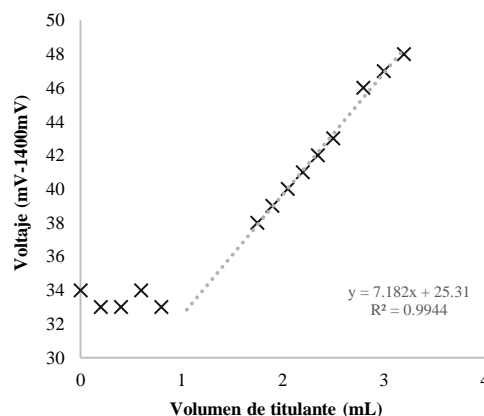


Fig. 5. Curva de titulación tras dilución de 60 minutos.

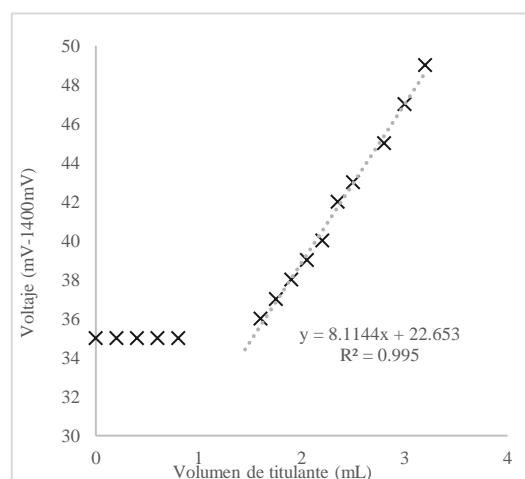


Fig. 6. Curva de titulación tras dilución de 120 minutos.

Dado que la temperatura incrementa no sólo la solubilidad, sino también la velocidad a la que se produce, se realizó la disolución de la muestra, mediante agitación durante 1h en baño térmico a 50 °C, por duplicado. En la Fig. 7 se presentan las dos curvas resultantes del ensayo. Surge de ellas que no hay un claro cambio de pendiente, como sí se observan en las curvas de las Fig. 4, 5 y 6. Aunque las muestras se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente antes de la titulación, la temperatura elevada produjo cambios irreversibles en las estructuras de las macromoléculas que afectaron la formación del complejo. Esos cambios seguramente se relacionan con modificaciones en la amilopectina, su solubilización e hidratación por efecto de la alta temperatura, lo que redundaría en una interacción diferente con el triyoduro.

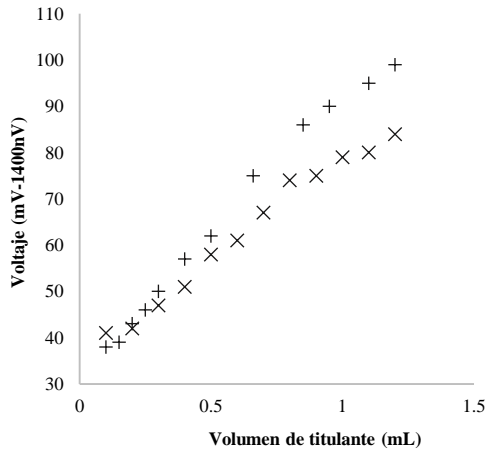


Fig. 7. Efecto de la temperatura. (+) original (x) duplicado

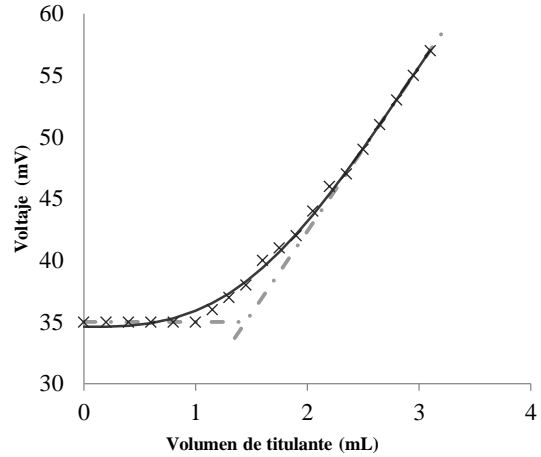


Fig. 8. Curva de titulación utilizando curva sigmoidea, junto a recta paralela a abscisas y recta tangente en punto de inflexión

El punto final de la titulación se encuentra en la intersección entre las curvas anterior y posterior a la saturación de la amilosa. Inicialmente los resultados se obtenían a través de regresiones lineales, eligiendo anteriores y posteriores al cambio de pendiente y ajustando separadamente. Este método presentaba dificultades, ya que el resultado dependía de qué datos se tenían en cuenta y cuáles se desechaban. Fue necesario establecer un método que nos brinde el mejor ajuste para las curvas, con todos los valores obtenidos, en particular, aquellos posteriores a la saturación de la amilosa, donde se observan las mayores variaciones en el voltaje. La curva sigmoidea brindó el mejor ajuste, hallándose el punto final como intersección entre la recta paralela a abscisas que pasa por los primeros puntos de la curva y la tangente al punto de inflexión, en la zona de máxima pendiente (ver Fig. 8); la expresión de la sigmoidea se muestra en la Ec. (4).

$$mV = d - \frac{a-d}{(1+e^{bx})} \tag{4}$$

Dónde:

- mV: Potencial medido en milivoltios.
- V: Volumen de titulante utilizado, en mL.
- a, b, c y d: Coeficientes de la curva.

Para asistir al cálculo, se desarrolló un programa escrito en lenguaje C#, usando como base la versión más simplificada de optimización no lineal, utilizando el método de gradiente decreciente (Lasdon et al, 1974). Se trata de un algoritmo que minimiza funciones: dada una función, definida por un conjunto inicial de parámetros, se realizan cálculos iterativos que desplazan ese conjunto hacia valores que minimizan esa función, dando pasos en el sentido opuesto a la función gradiente valuada en esos parámetros.

Los cálculos que se realizan son los siguientes:

$$X_{i+1} = X_i - \alpha \nabla f(X_i) \tag{5}$$

Dónde:

- X: Vector de parámetros de la ecuación.
- i: Número de iteración.
- α : Paso de la iteración.
- ∇f : Gradiente de la función objetivo a minimizar.

Para esto se consideró como función objetivo la sumatoria de los errores cuadrados del modelo matemático implementado:

$$F_{obj}(X) = \sum_{i=1}^n (V_i - f_i(X))^2 \tag{6}$$

Dónde:

- F_{obj} : Función objetivo.
- X: Vector de parámetros a determinar.
- V_i : Medición i.
- $f_i(X)$: Modelo matemático i, valuado en (X).

En la Figura 9 se muestra un ejemplo gráfico del funcionamiento del algoritmo; cada punto sobre la superficie es una iteración del programa. Se puede observar que el algoritmo funciona de manera análoga al descenso de una partícula por una pendiente, hasta llegar al punto de menor altura.

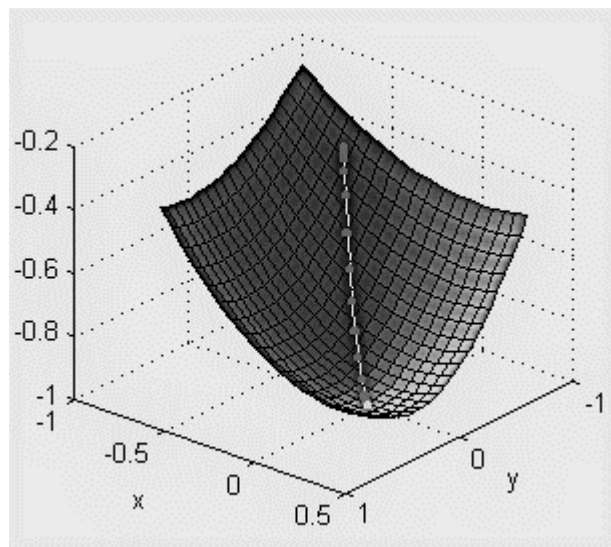


Fig. 9. Ejemplo de función multivariable.

TABLA 1. Afinidades de la amilosa de diversas fuentes.

Origen botánico	AI_{Am}^1
<i>Amilosa de papa</i> ¹	19,9
<i>Amilosa de maíz</i> ¹	19
<i>Amilosa de mandioca</i> ¹	18,6
<i>Amilosa de trigo</i> ¹	19,9
<i>Amilosa de arroz</i> ²	17,6
<i>Promedio</i> ³	19,35
<i>Desv. Std.</i>	0,66

Notas:

¹Schoch, T. J. (1964).

²Hamori, E., & Kallay, M. C. (1972).

³Se calculó excluyendo el valor para arroz.

Todos los cálculos previamente mostrados se implementaron con el software desarrollado, con el fin de automatizar los cálculos y agilizar la operación. El mismo puede aplicarse a cualquier tipo de titulación que presente una curva de ese formato. Como puede apreciarse en la Fig. 10, el error cuadrado cae exponencialmente con el número de iteraciones que el programa realiza. Si bien se utilizó la versión más simple del algoritmo del gradiente decreciente, el mismo bastó para obtener excelentes resultados en el ajuste de los parámetros.

El código fuente del programa puede obtenerse a través del link citado en bibliografía (Benelli, 2017).

Finalmente, para el cálculo del contenido de amilosa, se debe tener presente la estequiometría de la reacción de formación del triyoduro (Ec. 2), así como la afinidad de este último por la amilosa (Schoch, 1964). En la Ecuación (5) muestra todos los parámetros para el cálculo:

$$\%Am = \frac{V \times C \times z \times PM \times 100}{m \times AI_{Am}} \quad (5)$$

Donde V y C representan el volumen y concentración del titulante, respectivamente, $z=3$ ya que por cada mol de iodato consumido se liberan 3 de iodo (Ec. 3), PM es el peso molecular del I_2 (254), m es la masa de almidón utilizada y AI_{am} representa la afinidad de la amilosa. En la Tabla 1 se observa que este valor depende del origen de la amilosa.

En la Fig. 11 se muestran las curvas obtenidas para todas las muestras analizadas y en la Tabla 2 se detallan los valores de volumen de titulante obtenidos.

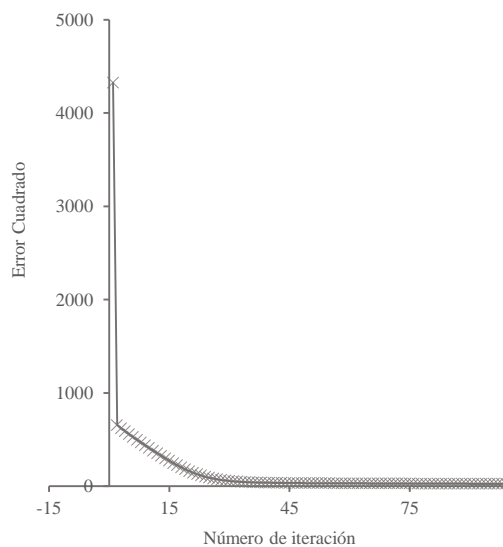


Fig. 10. Error cuadrado en función del número de iteración.

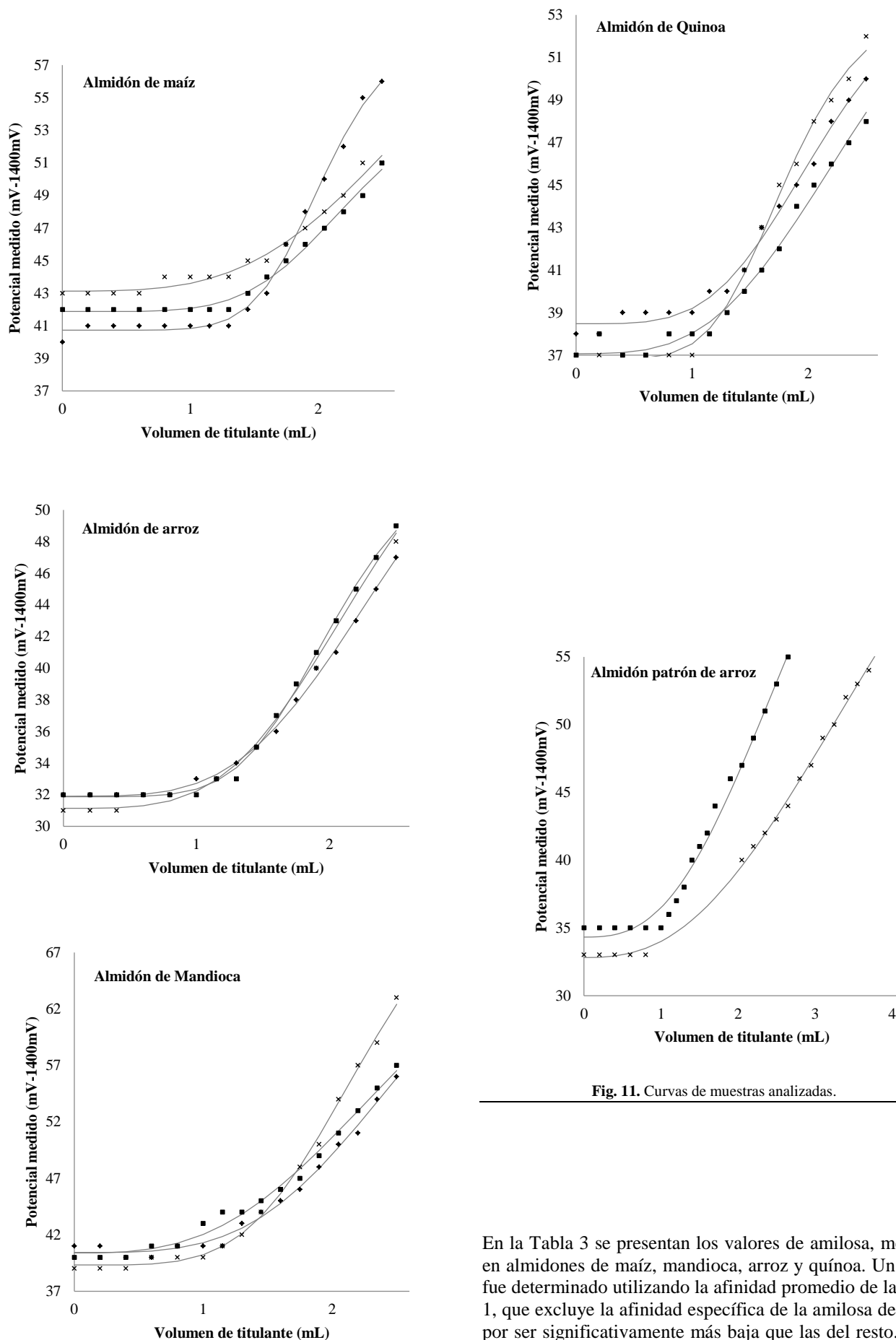


Fig. 11. Curvas de muestras analizadas.

En la Tabla 3 se presentan los valores de amilosa, medidos en almidones de maíz, mandioca, arroz y quínoa. Un grupo fue determinado utilizando la afinidad promedio de la Tabla 1, que excluye la afinidad específica de la amilosa de arroz, por ser significativamente más baja que las del resto. Entre paréntesis, se dan los resultados calculados a partir de las afinidades específicas.

TABLA 2. Volúmenes de solución titulante obtenidos.

Almidón	Masa (mg)	Volumen de titulante (mL)
	35,6	1,5
Maíz	36,2	1,5
	34,5	1,4
	36,5	1,3
Arroz	35,4	1,4
	36,6	1,2
	36,2	1,2
Mandioca	36,1	1,2
	36,3	1,2
	36,2	1,2
Quinoa	36,1	1,3
	36,3	1,3
	29,7	1,4
Patrón de Arroz	30,7	1,4

TABLA 3. Determinaciones de amilosa en almidones.

Origen del Almidón	Porcentaje de amilosa ¹	Desviación Estándar
<i>Maíz</i>	16,6 ^c (16,9 ^c)	0,5
<i>Mandioca</i>	12,6 ^a (13,2 ^a)	0,2
<i>Arroz</i>	14,2 ^{ab} (15,6 ^{bc})	0,6
<i>Patrón de Arroz</i>	18,8 ^d (20,7 ^d)	0,4
<i>Patrón de Arroz (enzimático)</i>	20,0 ^{d2}	---
<i>Quinoa</i>	13,8 ^a	0,5
<i>Quinoa (enzimática)</i>	13,3 ^{a,3}	1,5

Notas:

¹Los valores entre paréntesis se calcularon con las afinidades individuales dadas en tabla 1.²Megazyme International Ireland, 2015.[14]³Cervilla et al., 2015⁴Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Test: LSD Fisher, Alfa=0,05 DMS=1,61642

Como podemos apreciar allí, la mayor diferencia surge en el almidón de arroz. Si tomamos como referencia el valor obtenido por el método enzimático, el resultado calculado con la afinidad específica de la amilosa de arroz parece más próximo, pero sin dudas que, para mejores resultados es necesario establecer valores más fiables de la afinidad. Una *t* de Student, aplicada a los valores medios y desviaciones estándar para amilosa de quinoa, obtenidos por este método y el enzimático, arrojó que no había diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). El principal propósito de este trabajo fue mostrar que es posible medir la amilosa del almidón, un procedimiento cuidado para la preparación y titulación de la muestra y el auxilio de un software apropiado para hallar el punto final de la titulación. No obstante, sería necesario profundizar el estudio, a través de la medición en almidones de orígenes botánicos diversos y

composición conocida por métodos de referencia, para poder universalizar su utilización.

CONCLUSIONES

Los datos expuestos muestran una muy buena correlación con los obtenidos por el método enzimático, actualmente considerado como de referencia.

Por su simpleza y rapidez de aplicación, este método resulta muy apropiado para la realización de una gran cantidad de determinaciones en poco tiempo, quedando el método enzimático como una referencia para la contrastación, a fin de validar el procedimiento amperométrico.

La implementación de un software capaz de automatizar los cálculos facilita la operación y abre puertas a la automatización total del mecanismo de titulación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es dedicado a la memoria de nuestro compañero y amigo, Vicente Gianna. El cual brindó su apoyo incondicional hasta el último momento.

REFERENCIAS

- [1] Benelli F. E. (2017). "Adjust Sigmoid Parameters", tomado de, <https://github.com/fedebenelli/Adjust-Sigmoid-Parameters/blob/master/Program.cs>. (2017)
- [2] Calandri E. Almidón. (2015). En: aprovechamiento integral del grano de quinoa. Aspectos Tecnológicos, Fisicoquímicos, Nutricionales y Sensoriales. Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba. Pág. 105. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/1846>
- [3] Cervilla N.S., Miranda Villa P.P., Mufari J.R., Calandri E.L., Guzmán C.A. (2015). Almidón de quinoa. Propiedades de pasting e hidratación. Comparación con otros almidones. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 3 a 5 de noviembre de 2015. Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-987-22165-7-3
- [4] Copeland L., Blazek J., Salman H., Tang M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. 23, pág. 1527–1534
- [5] Dergal Badui, S. (2006A). Química de los Alimentos. Cuarta ed. Pearson-Addison Wesley. Pág. 81
- [6] Duan D. X., Donner E., Liu Q., Smith D. C., Ravenelle F. (2012). Potentiometric titration for determination of amylose content of starch – A comparison with colorimetric method. *Food Chemistry*. 130, pág. 1142–1145
- [7] Gibson T.S., Solah V.A., McCleary B.V. (1997). A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin. *Journal of cereal science*. 25(2) pag. 111-119
- [8] Hamori, E., & Kallay, M. C. (1972). Rate studies of the amylose-iodine reaction in unfractionated starch samples of various plant origin. *Biopolymers*, 11, 475–482.
- [9] Kaufman R.C., Wilson J.D., Bean S.R., Herald T.J., Shi Y.-C. (2015) *Carbohydrate Polymers*. 115, pág. 444–447
- [10] Larson B. L., Gilles K. A., Jenness R. (1953). Amperometric Method for Determining the Sorption of Iodine by Starch. *Anal. Chem.* 25 (5), 802–804
- [11] Martini J. M. y Storani F. Desarrollo del proceso de obtención de almidón a partir de granos de *Chenopodium Quinoa Willd.* mediante la utilización de métodos químicos, físicos y/o enzimáticos. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC. Diciembre de 2010.
- [12] McCready K. M. and Hassid D W. (1943). The Separation and Quantitative Estimation of Amylose and Amylopectin in Potato Starch. Berkeley, California. 65. pag. 1154-1157

- [13] Megazyme International Ireland. (2015). Amylose/amylopectin assay procedure k-amyl 06/15 for the measurement of the amylose and amylopectin contents of starch. https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-AMYL_DATA.pdf
- [14] Schoch, T. J. (1964). Iodimetric determination of amylose. Potentiometric titration: Standard method. In R. L. Whistler (Ed.). *Methods in carbohydrate chemistry* (vol. IV, pp. 157–160). New York: Academic Press Inc.
- [15] Séne M., Thévenot C., and Prioul J. L. (1997). Simultaneous Spectrophotometric Determination of Amylose and Amylopectin in Starch from Maize Kernel by Multi-Wavelength Analysis. *Journal of Cereal Science*. 26, pag. 211–221
- [16] Steffolani M. E., León A. E. and Pérez G. T. (2013). Study of the physicochemical and functional characterization of quinoa and kañiwa starches *Starch/Stärke*, 65, pag. 976–983.
- [17] Tizzotti M. J., Sweedman M. C., Tang D., Schaefer C., and Gilbert R. G. (2011). New ¹H NMR Procedure for the Characterization of Native and Modified Food-Grade Starches. *J. Agric. Food Chem.* 59, pag. 6913–6919
- [18] Vincent C. A., and Ward J. G. (1969). A simple Amperostat for Coulometric Titration. *J. Chem. Ed.* 46 (9), 613–614
- [19] Wang J. P., Yu B., Xu X.M., Yang N., Jin Z.Y., Kim J. M. (2011) Orthogonal-function spectrophotometry for the measurement of amylose and amylopectin contents. *Food Chemistry*. 127, pag. 102–108
- [20] Whistler R. y Daniel J. R. *Carbohidratos*. (1993) En: Fennema O. *Química de los Alimentos*. Segunda Ed. Editorial Acirbia s.a. Pag. 131
- [21] Zhu, T., Jackson, D. S., Wehling, R. L., & Geera, B. (2008). Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. *Cereal Chemistry*, 85, 51–58
- [22] Lindeboom N., Chang P. R., Falk Kevin C., Tyler R. T. (2005). Characteristics of Starch from Eight Quinoa Lines. *Cereal Chem.* 82(2). 216–222
- [23] Rosin P. M., Lajolo F. M., Menezes E. W. (2002). Measurement and Characterization of Dietary Starches. *Journal Of Food Composition And Analysis*. 15, 367–377
- [24] Séne M., Thévenot C., Prioul J. L. (1997). Simultaneous Spectrophotometric Determination of Amylose and Amylopectin in Starch from Maize Kernel by Multi-wavelength Analysis. *Journal of Cereal Science*. 26, 211–221
- [25] Lasdon, L. S.; Fox, R. L.; Ratner, M. W. (1974). Nonlinear optimization using the generalized reduced gradient method. *RAIRO - Operations Research - Recherche Opérationnelle*. 8 (V3) 73-103