

CUANTIFICACION DE PROTEINA DE TUBERCULO DE PAPA (*Solanum tuberosum*, L.) POR TECNICA DEL COLORANTE LIGADO.

CEFERINA R. ORDOÑEZ¹

Recibido: 26-06-91

Aceptado: 04-11-91

RESUMEN

*Se describe un método directo para determinar la proteína total (PT) de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*, L) basado en la técnica del colorante ligado (Orange G.)*

La cuantificación de PT en polvo de parénquima de 5 cvs de 3 cosechas 1983-1986, se realizó comparando la fijación del colorante en un proteína testigo. Estos valores se correlacionaron con los obtenidos por un método indirecto (Conti et al., 1976). La técnica es útil y la menor variabilidad se verificó para contenidos de PT de 1,7 a 2,1 g%.

Palabras claves: papa, proteína, colorante-ligado.

PROTEIN QUANTIFICATION BY DYE-BINDING METHOD IN POTATO TUBER

SUMMARY

A colorimetric method to quantify protein content in potato tuber by a dye-binding technique with the dyestuff Orange G is described. The protein values by this direct proposed method were correlated with those obtained by an indirect method (Conti et al., 1976).

The method is useful when protein content were 1,7 to 2,1 g% because a minor variability.

Key words: potatoes, protein, dye-binding.

INTRODUCCION

La determinación de proteína total: PT, de los tubérculos de papa *Solanum tuberosum* L., sigue siendo motivo de estudios. Se pueden valorar indirectamente por el nitrógeno total: NT aplicándose el método de Kjeldahl con sus distintas variantes y el NT se convierte a PT multiplicando por el factor 6,25. (Marenzi et al., 1947; Winton y Winton, 1947; Gitter-Heilmeyer, 1960; AOAC, 1970).

Los tubérculos de papa presentan un alto contenido de nitrógeno no proteico NNP, del

cual 23-49 % es nitrógeno alfa-amínico, 31-49 % es nitrógeno amídico y cantidades variables de nitratos (Podestá, 1966; Desborough-Wieser, 1974; Vige-Li, 1975). Luego el valor de NT puede conducir a una sobre estimación del de PT. Además, la mineralización de muestras vegetales por Kjeldahl presenta algunos inconvenientes (Laredo-Torres, 1979) y la cuantificación del amoníaco por microtécnicas colorimétricas es muy sensible a la estabilidad de los reactivos y a las condiciones de la reacción utilizada (Marenzi et al, 1947).

¹Cátedra de Bioquímica, Departamento de Química de la Facultad de Agronomía de UBA. Avda. San Martín 4453. 1417 Buenos Aires. Argentina

Udy (1953) determinó la PT de semillas por técnica basada en el colorante ligado. Posteriormente, se utilizó dicha técnica en el análisis de PT de otros materiales vegetales (Mackenzie-Perrier, 1969; Kaldhy et al., 1972; Swaninatam et al, 1973; Bradford, 1967).

En los ensayos previos a este estudio, se estudiaron estas técnicas, pero los resultados no fueron convicentes. Por ello se propone la presente técnica para determinar la PT en polvo de parénquima de tubérculo de papa, basada en el colorante ligado, empleando el reactivo-color de Outen et al. (1966); comparativamente se verifica el comportamiento a la fijación del colorante en polvo de una proteína testigo.

Los valores obtenidos se compararon con los resultados de aplicar el método de Conti et al. (1976) al análisis de dichas muestras.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Tubérculos de papa, *Solanum tuberosum*, L. cosechas 1983/84, 1984/85 y 1985/86, respectivamente años: I, II y III de nuestro ensayo de tuberización. Plantación en el Campo Experimental de la Cátedra de Horticuultura de la FA-UBA 34°35'S; 58°29'W, 25 m; diseño y prácticas descriptas anteriormente, Ordoñez et al, 1987). Los cultivares usados y las fechas de extracción y/o cosecha se indican en el Cuadro N°1.

Determinaciones

Materia seca (MS). Sobre alícuotas de parénquima de papa fresca, según técnica del AOAC (1970, norma 29.005; Ordoñez et al, 1982 y 1987). Valores expresados en g%.

Proteína

a) Obtención del polvo A. Diez tubérculos de papa se pelaron manualmente con pela-papas, se trozaron y se secaron en estufa convencional a $60^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}$ por 24 hs. El materia deshidratado se molió en molinillo a cuchillas (Rodríguez Torres). El polvo resultante se tamizó por tamices Tyler, recogiendo la fracción pasante por tamiz N°80 y retenida por N°100 (apertura de malla 0,177 y 0,149 mm).

b) determinación: método propuesto, Outen-Ordoñez: 0.0

Reactivos según Outen et al (1966).

solución colorante (reactivo-color) 1,00 g de Orange G (Fluka) en 1000 mL de solución reguladora de citrato-fosfato: concentración 0,1M y 0,01 M, respectivamente, ajustada a pH=2,2 (pHmetro Lufmman-Neuberger, S= 0,1 unidad de pH). Tampones contrastantes Carlo Erba.

I) Fijación del colorante: P

En erlenmeyer de 50 mL se disponen 250 mg \pm 0,1 de polvo A (exactamente pesados en balanza Mettler S₄) y 25 mL de reactivo-color. Se tapa y agita en agitador de Kahn, por dos períodos de 15 minutos, con un descanso intermedio de 10 minutos. Se filtra por papel S y S N°597, recogiendo el filtrado, solución P.

Fijación del colorante en proteína testigo T

En un erlenmeyer de 50 mL se disponen $00 \pm 0,1$ de polvo de alfa-amilasa (Fluka, pureza 99,9%) que se tratan de igual forma que P. Se obtiene la solución T.

"Cuantificación de Proteína de tubérculo de papa ..."

Cuadro N°1. Calendario de plantación, extracciones o tandas y cosecha del material utilizado.

Año I							
plantación:	24-08-83						
cv/extracción	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª		Cosecha
fecha	24-10	8-11	21-11	4-12	19-12		
Bonaerense							
la Ballenera	+	+	+	+	+		23-01-84
Draga	+	+	+	+	+		27-12-83
Huinkul MGA	+	+	+	+	+		23-01-84
Kennebec	+	+	+	+			19-12-83
Spunta	+	+	+				04-12-83
Año II							
plantación:	22-8-84						
cv/extracción	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Cosecha
fecha	2-10	6-11	20-11	4-12	21-12	4-1-85	
Bonaerense							
la Ballenera	+	+	+	+	+	+	18-01-85
Huinkul MGA	+	+	+	+	+	+	18-01-85
Kennebec	+	+	+	+	+		04-01-85
Spunta	+	+	+	+			21-12-84
Año III							
plantación:	23-8-85						
cv/extracción	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª		Cosecha
fecha	20-10	19-11	6-12	20-12	6-1		
Bonaerense							
la Ballenera	+	+	+	+	+		20-01-86
Huinkul MGA	+	+	+	+	+		20-01-86
Kennebec	+	+	+	+			06-01-86
Spunta	+	+	+				20-12-85

CEFERINA R. ORDOÑEZ

II) Colorimetría

En matraces aforados de 50 mL se dispone:

matraz P: 1,00 mL de solución P

matraz T: 1,00 mL de solución T

matraz B: 1,00 mL de solución de reactivo color.

Completándose a volumen con solución reguladora de citrato fosfato.

La absorbancia DO se leyó en fotocolorímetro (Crudo Caamaño) a 470 nm.

Para cada cv y fecha analizados se hicieron sextuplicados de P, triplicados de T y una determinación de B.

-Cálculos

$DO_B - DO_T =$ unidades de DO denominadas alfa A representa la disminución del color del reactivo por su fijación en 100mg de alfa-amilasa (proteína testigo).

$DO_B - DO_P =$ unidades de DO denominadas P representan la disminución del color del reactivo por su fijación en 250 mg de polvo (proteína problema).

$$PT \% SSS = \frac{\Delta P \times 100 \text{ mg} \times 100 \text{ g}}{\Delta \text{ alfa A} \times 250 \text{ mg}} =$$

$$= \frac{\Delta P}{\Delta \text{ alfa A}} \times 40$$

que puede ser referido a material fresco:

$$\frac{PT \% \times MS \text{ g}}{100} = PT \text{ g} \%$$

c) método de contraste, Conti et al.: CRG (1976).

Cuantifica el nitrógeno total (NT) como amoníaco, por la reacción de Berthelot

modificada. Curva de calibración con sulfato de amonio p.a. Fluka, pureza 99,5%.

Cálculo

$$NT \text{ mcg} \% = \frac{\text{mcg N } (DO_p) \times 20 \text{ mL} \times 100 \text{ g}}{0,05 \text{ g} \times 0,1 \text{ mL}} =$$

$$= \text{mcg N} \times 4 \times 10^5$$

Estadística

Se calcularon los valores promedio y desvíos estándar (DS) para cada cultivar y años de cosecha. Se analizaron los valores de CRG vs 0.0, por un test "t" de Student, nivel de significancia 5%. Se correlacionaron los valores para cada cv y en cada año estudiado.

Se correlacionaron todos los valores CGR vs 0.0., la función lineal fue la que presentó mejor ajuste (Cochran-Cox, 1978).

RESULTADOS

En los Cuadros N°2,3 y 4 se informan los valores de PT de las tres cosechas analizadas, discriminándose por cultivar.

Año I

De los 18 pares de datos, solamente un par de Ballenera no presentó diferencias estadísticamente significativas (Cuadro N°2).

Año II

Sobre 16 pares no presentaron diferencias significativas un par del cv Ballenera y dos de Kennebec (Cuadro N°3).

Año III

De 21 pares de datos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas,

"Cuantificación de Proteína de tubérculo de papa ..."

Cuadro N°2: Valores de PT según los métodos de GRG y O.O. Año I

cv	Ballenera				Draja			
método	GRG	n	O.O.	n	GRG	n	O.O.	n
tanda 1 ^a	-	-	-	-	1,49 ± 0,31	3	1,53 ± 0,007	3
2 ^a	1,39 ± 0,03	18	1,06 ± 0,04	6	-	-	-	-
3 ^a	1,50 ± 0,59	33	1,45 ± 0,04	6	2,04 ± 0,12	6	1,75 ± 0,28	6
4 ^a	1,81 ± 0,01	5	2,29 ± 0,02	6	1,70 ± 0,01	5	1,90 ± 0,17	6
5 ^a	1,93 ± 0,02	5	1,99 ± 0,02	6	1,27 ± 0,04	27	1,76 ± 0,03	6

cv	Huinkul				Kennebec			
método	GRG	n	O.O.	n	GRG	n	O.O.	n
tanda 1 ^a	1,67 ± 0,03	9	1,56 ± 0,06	9	-	-	-	-
2 ^a	1,74 ± 0,07	5	2,41 ± 0,03	6	-	-	-	-
3 ^a	2,04 ± 0,07	5	2,20 ± 0,03	6	1,65 ± 0,03	5	2,33 ± 0,02	6
4 ^a	2,90 ± 0,22	6	2,98 ± 0,12	6	1,94 ± 0,02	5	2,67 ± 0,06	6

cv	Spunta			
método	GRG	n	O.O.	n
tanda 1 ^a	1,97 ± 0,10	6	1,81 ± 0,04	6
2 ^a	1,66 ± 0,06	27	2,33 ± 0,03	4
3 ^a	1,75 ± 0,04	27	1,97 ± 0,02	6
4 ^a	1,81 ± 0,02	5	2,79 ± 0,34	6

Los valores GRG vs O.O. para cada cultivar y fecha difirieron significativamente, excepto el par con :
 Los casos indicados - ya no se disponia de material.

Cuadro N°3: Valores de PT según los métodos de GRG y O.O. Año II

cv	Ballenera				Huinkul			
método	GRG	n	O.O.	n	GRG	n	O.O.	n
tanda 4 ^a	1,14 ± 0,15	8	2,21 ± 0,10	6	1,21 ± 0,16	6	1,64 ± 0,00	6
5 ^a	1,61 ± 0,06	8	1,87 ± 0,10	6	1,18 ± 0,17	14	1,55 ± 0,04	6
6 ^a	1,95 ± 0,05	8	2,48 ± 0,03	6	-	-	-	-
cosecha	2,52 ± 0,99	9	2,89 ± 0,14	18	2,06 ± 0,12	6	2,62 ± 0,36	6

cv	kennebec				Spunta			
método	GRG	n	O.O.	n	GRG	n	O.O.	n
tanda 2 ^a	1,95 ± 0,09	6	2,14 ± 0,03	6	1,67 ± 0,28	14	1,80 ± 0,03	6
3 ^a	1,52 ± 0,03	8	1,74 ± 0,02	6	1,54 ± 0,01	8	1,97 ± 0,02	6
4 ^a	1,83 ± 0,11	8	1,90 ± 0,02	6	2,34 ± 0,104	8	2,72 ± 0,045	6
5 ^a	2,04 ± 0,09	5	2,32 ± 0,04	6	-	-	-	-
cosecha	2,04 ± 0,06	8	2,24 ± 0,06	8	1,61 ± 0,006	8	2,20 ± 0,01	6

Los valores GRG vs O.O. para cada cultivar y fecha difirieron significativamente, excepto el par con :
 De los cvs Bonserense la Ballenera y de Huinkul, no se disponia ya de muestras del material de 2^a y 3^a tandas.

CEFERINA R. ORDOÑEZ

Cuadro N°4: Valores de PT según los métodos de CRG y O.O. Año III

cv	Ballenera				Huinkul			
	CRG		O.O		CRG		O.O	
tanda		n		n		n		n
1 ^a	2,19 ± 0,06	6	-	-	1,70 ± 0,05	5	2,09 ± 0,00	6
2 ^a	1,83 ± 0,06	6	1,59 ± 0,016	6	1,60 ± 0,09	6	1,74 ± 0,52	6
3 ^a	1,90 ± 0,44	12	2,10 ± 0,02	6	2,39 ± 0,35	8	2,01 ± 0,04	12
4 ^a	2,16 ± 0,24	8	2,23 ± 0,29	6	2,57 ± 0,32	10	2,01 ± 0,03	6
5 ^a	2,99 ± 0,33	18	2,42 ± 0,15	24	2,16 ± 0,29	12	2,20 ± 0,25	18
cosecha	1,69 ± 0,01	8	1,86 ± 0,17	12	1,92 ± 0,01	8	2,06 ± 0,04	12

cv	Kennebec				Spunta			
	CRG		O.O		CRG		O.O.	
tanda		n		n		n		n
1 ^a	1,45 ± 0,10	6	1,65 ± 0,17	8	1,65 ± 0,19	15	1,86 ± 0,09	6
2 ^a	1,84 ± 0,06	6	1,77 ± 0,02	6	0,954 ± 0,11	6	1,32 ± 0,02	6
3 ^a	1,94 ± 0,32	20	1,67 ± 0,04	6	2,27 ± 0,02	8	2,34 ± 0,03	6
4 ^a	2,22 ± 0,10	12	2,02 ± 0,01	6				
cosecha	1,79 ± 0,007	8	1,62 ± 0,015	12	1,69 ± 0,001	8	1,26 ± 0,03	6

Los valores CRG vs O.O. ,para cada cultivar y fecha difirieron significativamente, excepto el par con :

Los casos indicados - ya no se disponía de material.

dos pares de Ballenera, tres de Huinkul y uno de Spunta (Cuadro N°4).

En el Cuadro N°5 se anotan los valores de correlación entre ambos métodos, discriminándose los valores por cosecha y cv. Los valores de r para Ballenera fueron elevados en los tres años, $r = 0,5334$ y $r^2 = 0,2845$ Kennebec y Spun

En la Fig. 1 se graficó la recta de regresión, considerándose 54 pares que incluyeron los 4 valores del cv Draga-año I. Se calcularon los valores $r = 0,6139$ y $r^2 = 0,3768$. La ecuación de regresión de la recta excluidos los valores de Draga es:

$$Y = 1,0305 + 0,5382 X$$

$$\text{Outer } Y = 1,0305 + 0,5382 X \quad G$$

con $r = 0,5334$ y $r^2 = 0,2845$

En el Cuadro N°6 se detallan los valores de MS de las tres cosechas analizadas.

DISCUSION

Las técnicas del colorante ligado aplicadas a la determinación de PT, se basan en el uso de colorantes de naturaleza ácida que fijan en los restos de aminoácidos básicos de proteínas polipéptidos: arginina, histidina y lisina, siendo el Orange G el más frecuentemente utilizado. La fijación está estrechamente relacionada con el pH de las soluciones del colorante y las características estructurales de la proteína a valorar.

Los métodos de Outen y de MacKenzie emplean polvo seco de muestra y reactivo-color con Orange G. La estimación de la proteína se realiza por correlelogramas trazados en función del contenido de N% del material analizado, según Kjeldahl. La variable dependiente en Outen son los mg de colorante fijado por g de muestra, y en MacKenzie la disminución del %T del reactivo-color, tratado con muestra problema.

"Cuantificación de Proteína de tubérculo de papa ..."

**Cuadro N°5: Correlación de valores CRG vs 0.0 discriminados por cv y cosecha. -
B: Ballenera; H: Huinkul; K: Kennebec; S: Spunta.**

Método/cv	B	H	K	S	<u>Año I</u>
CRG	1,66± 0,22	2,09±0,49	1,80±0,15	1,80±0,11	
O.O.	1,70± 0,40	2,29±0,51	2,50±0,17	2,23±0,38	
r	0,90	0,89	0,48	0,004	
r ²	0,81	0,79	0,23	-	
<hr/>					<u>Año II</u>
CRG	1,81± 0,50	1,48±0,41	1,88±0,19	1,79±0,32	
O.O.	2,36± 0,37	1,94±0,48	2,07±0,22	2,17±0,35	
r	0,80	0,91	0,993	0,887	
r ²	0,64	0,82	0,98	0,79	
<hr/>					<u>Año III</u>
CRG	2,114±0,46	2,057±0,35	1,848±0,25	1,64±0,47	
O.O.	2,04 ±0,289	2,018±0,18	1,748±0,14	1,70±0,44	
r	0,7866	0,44	0,664	0,778	
r ²	0,6187	0,19	0,441	0,60	

Cuadro N°6: Valores de MS g%, discriminados por CV y año de cosecha

<u>Año I</u>		B	H	K	S
cv					
tanda	1 ^a	13,90±0,0	15,87±0,26	14,01±0,91	15,62±0,35
	2 ^a	17,41±0,47	18,47±0,54	14,63±0,80	17,75±0,87
	3 ^a	15,35±0,33	17,21±1,32	16,41±0,11	14,39±0,15
	4 ^a	19,15±0,86	24,97±0,66	24,31±0,39	19,67±0,52
	5 ^a	16,32±0,65	16,62±0,34		
COSECHA		16,92±0,56	14,70±0,59	21,87±2,29	19,61±1,35
<u>Año II</u>					
tanda	2 ^a			15,32±0,53	15,73±0,67
	3 ^a			18,06±0,99	17,61±0,80
	4 ^a	14,82±0,82	15,67±0,77	19,37±1,16	20,73±0,77
	5 ^a	18,12±0,97	16,68±0,40		
	6 ^a	19,82±0,61			
COSECHA		20,73±0,54	23,10±2,45	24,40±0,93	18,99±0,87
<u>Año III</u>					
tanda	1 ^a	16,47±0,97	15,80±1,08	14,47±1,43	14,64±0,61
	2 ^a	14,60±0,44	15,63±0,43	18,87±0,94	17,75±0,76
	3 ^a	19,45±0,95	17,08±0,96	19,78±1,16	16,92±1,45
	4 ^a	19,22±0,82	21,50±1,30	19,30±2,00	
	5 ^a	20,26±1,17	22,04±1,58		
COSECHA		17,15±1,05	20,15±1,79	18,03±0,92	17,76±1,34

CEFERINA R. ORDOÑEZ

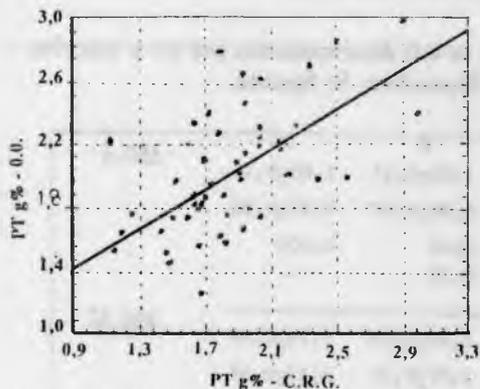


Figura 1: Recta de regresión entre ambos métodos (CRG y 0.0); PT: proteína total.

La metodología propuesta en nuestro estudio también cuantifica directamente la PT en polvo de papa seco, obvia mineralización y dosaje de amoníaco, con ahorro de tiempo y reactivos.

El estado de división de la muestra y la proteína testigo son importantes. Los ensayos previos hechos con caseína Hammarsted, zeína y lactoalbúmina BDH y ureasa Flucka dieron una repetitividad inferior a la lograda con la alfa-amilasa.

El análisis de los datos de los Cuadros N° 2, 3 y 4 demostró diferencias estadísticamente significativas entre los valores GRG vs 0.0. en muchos de los casos; es decir difieren los datos de PT obtenidos por los dos métodos. Independientemente de esto, la presente técnica es de interés para tener rápidas respuestas frente a la determinación de proteína total en tubérculos de papa, útil en los aspectos bromatológicos, nutricionales y de selección, entre otros.

De la Figura 1 se infiere que los valores de proteína total de 1,7 a 2,1g% son los que presentaron menor variabilidad; en ese rango, los valores suministrados por este método resultan confiables. El método de contraste,

de tipo indirecto está afectado por los factores indicados precedentemente, lo cual incide en el resultado final. De allí que probablemente el rango de utilidad del 0.0 sea mayor.

Por otra parte conviene destacar que Outen y Mackenzie indican que la exactitud analítica del macro Kjeldahl es superior a la del colorante ligado, pero éste es una alternativa muy válida, según fines perseguidos.

CONCLUSIONES

De lo experimental se arriba a las siguientes conclusiones:

- La determinación de proteína de papa en polvo seco de parénquima, por la técnica de colorante ligado que se propone es de rápida ejecución, sensible y con repetitividad.
- De las proteínas testigo estudiadas, la alfa-amilasa Flucka es la más aconsejable.
- Los valores absolutos obtenidos por este método directo, en la mayoría de los casos difirieron significativamente con los datos por el método indirecto de Conti et al. (1978).
- La menor variabilidad se observó para valores entre 1,7 a 2,1 g% sobre materia fresca, respecto al método de contraste.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. C.A. Roig y al Sr. Marcelo Lucero por los cálculos de ecuación de regresión y a la técnica señora Zelmira Galaso de Jacquet por su importantísima colaboración en la parte experimental.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AOAC. 1970. "Methods of analysis of Association of Official Agricultural Chemistry", ed 9^a, Washington.
- 2) BRADFORD MARION. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Chem.*, 72:248-256.
- 3) COCHRAN W.G. y G.M. COX. 1978. "Diseños experimentales" ed 5^a, Ed. Trillas, Méjico.
- 4) CONTI, MARTA E.; M. RITCHER y LIDIA GIUFFRE. 1976. Método de determinación rápida del nitrógeno en suelo. *Rev. IDIA*, (7.12):119-122.
- 5) DESBOUROUGH, S.L. and C..J. WIESER. 1974. Improving potato protein. -I-Evaluation of selection techniques. *Amer.Pot.J.*, 51(6):185-196.
- 6) GITTER, A. y L. HEILMEYER. 1960. "Pruebas Funcionales Clínicas" ed 5^a Ed. El Ateneo. Bs. As.
- 7) KALHDY, M.S.; W. MALEWSKI and P. MARKAKIS. 1972. Estimation of potato protein content by dye binding. *Amer.Pot.J.*, 49(5):177-181.
- 8) LAREDO, C., M.A. y S.H. TORRES. 1979. Efecto del catalizador en la determinación del nitrógeno en material vegetal. *Rev. IICA*, 14(4):215-220.
- 9) MACKENZIE, A.J. and E.R. PERRIER. 1969. Colorimetric determination of protein in feed and forrage crops. *Agron.J.*, 61:332. (febrero-marzo).
- 10) MARENZI, A.; C.E. CARDINI; R.F. BANFI y A.S. VILALLONGA. 1947. "Bioquímica Análitica Cuanitativa". Ed El Ateneo, Bs. As.
- 11) ORDOÑEZ, CEFERINA R.; J.C. LIMONGELLI; A. CHIESA; CECILIA I. ABARZA, SARA A. ALONSO; DIANA GIBSON; E.A. PAGANO; N.C. SZENTIVANYI y F. MARTINUZZI. 1982. Papas chips IX- Los HCNE del tubérculo de papa y su relación con las papas chips. *Rev. ABA*, 46(1-2):17-47.
- 12) ORDOÑEZ, CEFERINA R.; J.C. LIMONGELLI; A. CHIESA; MARIA E. DAORDEN; MARIA C. CAMDESSUS, E.A. PAGANO y N. TURSI. 1987. Curvas de tuberización en papas (*Solanum tuberosum*) y sus relaciones con peso unitario, la materia seca y los hidratos de carbono no estructurales (HCNE) *Gaceta agrónomica*, 7(39):376-391.
- 13) OUTEN, E.G.; J.A.M. TILLEY and R.F. WILSON. 1966. Estimation of protein in dried herbage using the dyestuff Orange G. *J.Sci.Fd. Agr.*, 17:285-286.
- 14) PODESTA, J.J.; N.S. de COTTELEY y J.C. SANAHUJA 1966. Estudio de la composición química y de su valor nutritivo de la fracción nitrogenada de la papa. VIII Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica 26/11-04/12 (Resumen Sesiones Comunicaciones) Bs. As., Argentina.
- 15) SWAMINATHAN K.; K.C. SUD and HART KISHORE. 1973. Rapid photomeric method for the determination of "true" protein content of potatoes based on non-selective dye-binding capacity. *Ind. J. Exptl. Biol.*, 11:63-64.
- 16) VIGUE, J and P.H. LI. 1975. Correlation between methods to determine the protein content of potato tubers. *Hort. Sci.*, 10(6):625-627.
- 17) WINTON, A.T. y K.E. WINTON. 1947. "Análisis de alimentos". Ed. HASA, Bs. As.
- 18) UDY, D.G. 1954. Dye-binding capacities of wheat flour protein fraction. *Cereal Chem.*, 31:389-395.