

00567
29.1



Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE QUIMICA

**LISINA-REACTIVA Y VALOR BIOLÓGICO DE SEMILLAS
PROCESADAS DE A. hypochondriacus**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS
(Química de Alimentos)

p r e s e n t a

Jorge Soriano Santos



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

La semilla de amaranto es una fuente excepcional de lisina, pero durante el proceso de reventado se induce la reacción de Maillard e incluso racemización de la proteína. Con objeto de lograr una producción industrial de "alegrías" que implique una pérdida mínima en su valor nutricional, se evaluó el efecto del tratamiento térmico en la calidad nutritiva de las "alegrías" tradicionales vs "alegrías" reventadas, mediante un sistema de lecho fluidizado [SLF]. Se cuantificó el contenido de lisina-reactiva por el método de "colorante ligado a lisina" [DBI] y se evaluó in vivo el amaranto reventado por los dos distintos procesos. Adicionalmente se trató de corroborar si la leucina es el principal aminoácido limitante en el amaranto. Se obtuvo la misma eficiencia de reventado, tanto para el método tradicional por contacto directo, como para el SLF ($p < 0.05$). El método DBI no resultó ser un buen estimador del daño provocado a la lisina, debido a que el tratamiento térmico es ligero, pues predominan las reacciones iniciales de Maillard. Esto no permitió el uso del método DBI con fines de monitoreo, por lo que no se encontró una correlación entre la evaluación química de lisina-reactiva y la evaluación biológica. En la semilla reventada por el SLF, no se observó un daño significativo a lisina, que en el reventado o tostado por contacto directo ($p < 0.05$). La calidad nutritiva del amaranto reventado o tostado por cualquiera de los dos métodos térmicos, no resultó ser más baja ($p < 0.05$), en relación al amaranto cocido utilizado como control, cuya calidad nutritiva fue similar al de caseína. El aminogra-

ma del amaranto reventado-tostado indicó ser limitante sólo en lisisna, cuando se le comparó con el patrón de requerimientos de aminoácidos para niños (FAO, 1973). También se observó la desaparición de cisteína y la aparición de cuatro compuestos que no fueron identificados, se presume pueden ser productos de reacción de cisteína con hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados o generación de nuevos aminoácidos como lisinoalanina, lantionina u ornitinoalanina. La leucina no fue el aminoácido limitante en el amaranto con o sin tratamiento térmico, pues no mejoró la calidad proteica ($p < 0.05$) de una dieta adicionada de leucina al nivel recomendado para la rata. Al suplementarse harina de nixtamal 50% con amaranto reventado por lecho fluidizado 50%, se mejoró la calidad nutritiva del maíz, con una cuenta química de 67.5 [limitante en lisina], en relación a 44 que presenta el maíz. El NPR, NPU y BV de la mezcla resultó ser mayor que para el maíz solo. No se detectó diferencia significativa ($p < 0.05$) en la digestibilidad del amaranto sometido a los diferentes procesos térmicos. Sin embargo, la adición de lisina o leucina al amaranto reventado o tostado por los distintos tratamientos térmicos, no mejoró la calidad nutritiva en ningún caso, lo que hace suponer que el daño provocado por el tratamiento térmico también lo sea para otros aminoácidos, además de lisina, como la cisteína. La aplicación de un flujo de aire caliente para el reventado de la semilla es una alternativa de procesamiento a nivel industrial, pues resultó estadísticamente igual al método tradicional.

Juís Raúl Tooa

SUMMARY

Amaranth seed is an exceptional lysine source, but throughout the popping process, the Maillard reaction and protein racemization take place. With the aim of achieving an industrial "alegría" process with a minimum loss in its nutritional value, we evaluated the effect of heat treatment on the nutritional quality of traditional "alegría" vs "alegría" popped by a fluid bed system (SLF). Reactive-lysine was quantified by the Dye Binding Lysine method (DBL) and the nutritional value of amaranth popped by both methods was evaluated *in vivo*. We also tried to confirm whether leucine was the main amaranth limiting amino acid. The same popping efficiency was found for the traditional direct contact method as for the SLF method ($p < 0.05$). The DBL method was not a good lysine damage estimator, because the initial Maillard reactions are predominant when the heat treatment is mild, this fact did not allowed us to use the DBL method as a scanning tool, and we did not find a correlation between the reactive-lysine and the biological evaluation. When the seed was popped by the SLF method we did not observe lysine damage than when it was treated by the direct contact roasting or popping methods ($p < 0.05$). The nutritional quality of amaranth treated by the two methods was not lower than the observed in boiled amaranth used as a control, whose nutritional quality is similar to casein. The popped-roasted amaranth aminogram was compared with the children amino acids requirements pattern [FAO, 1973] and resulted to

be lysine limiting. We also observed cysteine disappearance and four unidentified peaks were observed, which we suppose are reaction products of cysteine with hydroperoxides of unsaturated fatty acids, or new amino acids produced, such as lysinoalanine, ornithinoalanine or lanthionine. Leucine was not the limiting amino acid in amaranth popped or unpopped, because the protein quality of a leucine added diet was not different to a leucine free diet. When "nixtamal" flour was supplemented with SLF popped amaranth [50-50], the nutritional quality of corn was improved up to a chemical score of 67.5 (lysine limiting) compared with the 44 chemical score of corn itself. The mixture's NPR, NPU and BV were greater than those of corn. There was not significant difference ($p < 0.05$) among the digestibility of heat treated amaranth in different ways. However, lysine or leucine added to amaranth popped or roasted by whichever popping heat process did not improve the nutritional quality in any case, which may mean that the damage caused by heat treatment may affect another amino acids in addition to lysine and cysteine. The exposure to a hot air flow for seed popping, is a processing option statistically equal to the traditional method.

I N D I C E

Páginas

CAPITULO I

PANORAMA GENERAL DEL RESURGIMIENTO E INDUSTRIALIZACION
DEL AMARANTO ("ALEGRIA") COMO FUENTE PROTEICA DE ORIGEN

VEGETAL..... 1

INTRODUCCION

Antecedentes Históricos 1

Localización de las Principales Especies de Amaranthus.... 1

Rendimiento 2

Usos de la Semilla como Alimento 2

Características de Cultivo 3

Morfología 3

Composición Química y Valor Nutritivo 5

Calidad Protéica 7

Elaboración Tradicional del Dulce de "Alegria" 9

Importancia de la Evaluación del Valor Nutricional de Se-
millas Reventadas de Amaranto por un Método Industrial .. 10

Repercusiones Nutritivas en el Amaranto Sometido a Diferen-
tes Procesos y Alternativas de Procesamiento 12

Lisina Total, Lisina Disponible y Lisina-Reactiva 14

Utilidad del Método DBC para la Evaluación de Lisina-Reac-
tiva 16

OBJETIVOS 17

CAPITULO II

EFECTOS QUIMICO-BIOLÓGICOS EN ALIMENTOS RICOS EN PROTEÍNAS

TRATADAS TÉRMICAMENTE	20
<u>DETERIORO DE PROTEÍNAS</u>	20
Influencia del Calor sobre la Composición Química y Calidad	
Nutritiva de las Proteínas	20
Reacciones de Maillard (Obscurecimiento no Enzimático)	22
Reacciones Iniciales de Maillard (Azúcar-Amino)	24
Reacciones Finales del Obscurecimiento no Enzimático	26
Reacciones Proteína-Proteína	32
Isomerización	39
Reactividad de Hidroperóxidos de Lípidos con Proteínas y	
Aminoácidos	39
Métodos Químicos para Determinar Lisina-Reactiva	43
Limitaciones del Método DBL	53

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS	59
Características Físicas de la Semilla de "Alegria"	59
<u>REVENTADO DE LAS SEMILLAS Y EFICIENCIA DEL PROCESO</u>	59
Método de Contacto Directo y Lecho Fluidizado	59
Reventado del Maíz Palomero	60
<u>MÉTODOS QUÍMICOS</u>	60
Análisis Químico Proximal	60
Cocimiento y Deshidratación de Amaranto	61
Lisina-Reactiva por el Método DBL	61

<u>Análisis de Oxido Crómico para Prueba de Digestibilidad <u>in vivo</u></u>	64
Análisis de Aminoácidos	65
Racemización de Aminoácidos	66
<u>PREPARACION DE DIETAS</u>	67
Cálculos para la Preparación de las Dietas	75
<u>EXPERIMENTO BIOLOGICO</u>	81
Métodos de Evaluación Protéica	84
Prueba de Digestibilidad <u>in vivo</u>	84
<u>METODOS ESTADISTICOS</u>	85
CAPITULO IV	
RESULTADOS	86
Eficiencia del Reventado	86
Análisis Químicos de las Materias Primas	86
Lisina-Reactiva (DBL)	90
Análisis de Aminoácidos y Racemización	94
Evaluación Biológica	97
CAPITULO V	
DISCUSION	113
Eficiencia del Reventado	113
Correlación Lisina-Reactiva - Evaluación Biológica y Limitaciones del Método DBL como Estimador del Daño Provocado a la Lisina	115
Respuesta a la Adición de Lisina o Leucina en Dietas	120
Daño Directo a Aminoácidos	123
Calidad Nutritiva de las Mezclas Maíz-Amaranto	127

	Páginas
CAPITULO VI	
CONCLUSIONES	130
APENDICE 1,	134
APENDICE 2,	138
BIBLIOGRAFIA	140

LISTA DE TABLAS

Páginas

CAPITULO I

Tabla 1.1	Contenido de lisina y cuenta química en proteínas de diversos alimentos	8
-----------	---	---

CAPITULO II

Tabla 2.1	Formación de aldehidos durante la degradación de Strecker	31
Tabla 2.2,	Influencia del calor en las proteínas	38

CAPITULO III

Tabla 3.1	Composición de las dietas con y sin suplementación	69
Tabla 3.2	Composición y aportación a la dieta de la mezcla de vitaminas AIN-76	70
Tabla 3.3	Composición de la mezcla de minerales AIN-76	71
Tabla 3.4	Contribución de elementos de la mezcla mineral AIN-76 y amaranto a las distintas dietas	72
Tabla 3.5	Composición de dietas experimentales	74
Tabla 3.6	Dietas experimentales	76
Tabla 3.7	Aporte de aminoácidos esenciales en las dietas D y requerimientos de éstos por la rata	78
Tabla 3.8	Aporte de aminoácidos por la suplementación de harina de nixtamal-amaranto reventado (LF) 50-50 ..	79

CAPITULO IV

Tabla 4.1	Eficiencia del reventado de la semilla de amaranto por diferentes métodos	87
-----------	---	----

	Páginas
Tabla 4.2	Análisis químico proximal del amaranto sometido a diferentes tratamientos 88
Tabla 4.3	Análisis químico proximal de harina de nixtamal, palomitas de maíz y su suplementación con amaranto reventado por lecho fluidizado 89
Tabla 4.4	Curva estándar usada para lisina reactiva (DBL) ... 91
Tabla 4.5	Contenido de lisina-reactiva (DBL) en los distintos materiales empleados 92
Tabla 4.6	Perfil de aminoácidos de la semilla de amaranto ... 95
Tabla 4.7	Racemización de aminoácidos en amaranto crudo y reventado 96
Tabla 4.8	Niveles de lisina en las dietas de prueba 98
Tabla 4.9	Resultados del experimento animal durante la primera y segunda fases 100
Tabla 4.10	Pesos medios alcanzados al finalizar cada una de las fases experimentales del ensayo biológico 102
Tabla 4.11	Relación de eficiencia protéica (PER) de cada una de las dietas en ambas fases 104
Tabla 4.12	Contenido de nitrógeno y óxido crómico en heces y digestibilidad aparente en las dietas de prueba 106
Tabla 4.13	Retención neta de proteínas (NPR) y utilización neta de proteínas (NPU) 107
Tabla 4.14	Valor biológico (BV) estimado de las dietas experimentales 111

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
CAPITULO I	
Fig. 1.1 Corte transversal de la semilla de amaranto que muestra su morfología	4
CAPITULO II	
Fig. 2.1 Esquema simplificado de las reacciones de Maillard..	23
Fig. 2.2 Degradación de los compuestos de Amadori	27
Fig. 2.3 Degradación de Strecker	29
Fig. 2.4 Condensación de los grupos ϵ -amino de lisina y los grupos amida de glutamina y asparagina	33
Fig. 2.5 Formación de lisinoalanina y lantionina	35
Fig. 2.6 Estructura del ϵ -N-(1-deoxi-D-fructosil)-L-lisina ..	44
Fig. 2.7 Reacción de lisina con fluorodinitrobenceno (FDNB)..	46
Fig. 2.8 Estructura química del ácido naranja 12 A012.....	50
Fig. 2.9 Reacciones que se efectúan en la medición "A" de "colorante ligado a lisina" (DBL)	51
Fig. 2.10 Reacciones que se llevan a cabo en la medición "B" de "colorante ligado a lisina" (DBL)	52
Fig. 2.11 Reacción de A012 con los primeros productos de Maillard	55
Fig. 2.12 Reacción con formaldehído. Eliminación de basicidad de ϵ -amino	56

CAPITULO III

Páginas

Fig. 3.2	Esquema de estratificación de las ratas por pesos y distribución de dietas al azar. La Tabla muestra las sumas de pesos iniciales de las seis ratas por cada dieta	82
-----------------	---	-----------

APENDICE 1

Fig. A.1	Reventador de semillas por lecho fluidizado, adaptado a un secador por aspersión.....	136
Fig. A.2	Detalle del dispositivo para el reventado de las semillas	137

CAPITULO I

PANORAMA GENERAL DEL RESURGIMIENTO E INDUSTRIALIZACION DE AMARANTO ("ALEGRÍA") COMO FUENTE PROTEICA DE ORIGEN VEGETAL

INTRODUCCION

Antecedentes Históricos

Los Mayas y Aztecas en Mesoamérica e Incas en la Zona Andina, incluían en su alimentación la semilla de amaranto, conocida por los Aztecas como "huautli" ("alegría") (Ortiz de Montellano, 1978; Sumar, 1983). Esta semilla era de particular importancia para el pueblo mexicana, pues fue utilizada tanto para fines rituales (Marx, 1977) como tributarios hasta la llegada de Hernán Cortés a México, a principios del siglo XVI (Keith, 1979).

Localización de las Principales Especies de Amaranthus.

Las especies de A. hypochondriacus y A. cruentus son nativas de México y Guatemala, predominando en México la variedad A. cruentus. Actualmente se les puede hallar también en Nepal, India y Estados Unidos, mientras que en Perú, Argentina y Bolivia se localizan las especies de A. caudatus, también conocida como A. edulis, siendo todas productoras de semillas. Las hojas de algunas amarantáceas son comestibles y su valor nutritivo es similar a las especies productoras de semillas; e.g., A. hybridus que en México se conoce popularmente como "quintonil", también conocida en Tailandia como "phakhom", "bayam" en Malasia e Indonesia o "urai" en Filipinas. Un ejemplo

adicional es el A. lividus que se consume en Grecia con el nombre de "vleeta". Otras especies de Amaranthus aunque comestibles, son utilizadas como plantas de ornato por los colores vivos que presenta o usadas como forraje (NRC, 1984).

Rendimiento

Actualmente el amaranto se cultiva en pequeña escala en México, América Central y del Sur, y en algunos países de África y Asia (NRC, 1984). Los rendimientos del cultivo se determinan tanto por factores genéticos como ambientales. Los agricultores norteamericanos consideraran como buenos rendimientos de 400 a 500 kg de semilla/ha (Martineau, 1985) pero en la literatura se han registrado rendimientos de 1.1 ton/ha (Rutle, 1976), en África los rendimientos han sido de 4 a 6 tons/ha del grano seco de A. hybridus subespecie cruentus (Uzo y Okorie, 1983) mientras que en nuestro país se han encontrado rendimientos de 100 a 2500 kg/ha (Sánchez-Marroquín, 1980).

Usos de la Semilla como Alimento

En México la semilla de amaranto se consume principalmente en forma de "alegría", i.e. un panecillo dulce hecho con las semillas reventadas o tostadas mezcladas con miel o piloncillo (Macazaga, 1985) y que por coincidencia gastronómica, algunos campesinos peruanos elaboran de una manera similar (Sumar, 1983). También en diversas regiones de nuestro país la semilla se usa en la elaboración de alimentos típicos como el pinole, tamales y atole (Sánchez-Marroquín, 1980). Como verdura se le conoce como "huauzontle" en México; inflorescencia

a manera de racimo que se prepara capeada con huevo y luego frito con queso en su interior, acompañándola con caldo de jitomate; pero antes de inflorecer y tierno se le consume cocido en la forma de "quintonil" (Macazaga, 1985).

Características de Cultivo

Entre las plantas tropicales, a pesar de que las amarantáceas aparentemente se originaron en regiones no necesariamente tropicales, pocas son de tan fácil cultivo como el amaranto. Es una planta extraordinariamente resistente a las condiciones climáticas, que crece casi en cualquier sitio donde haya luz solar y humedad suficiente, e inclusive algunas especies pueden cultivarse en condiciones salinas. A las cinco semanas de su cultivo produce hojas semejantes a la espinaca, que pueden consumirse como verdura y a partir de este momento semanalmente puede representar un cultivo de hojas comestibles, hasta los seis meses que es cuando produce miles de semillas. En condiciones favorables las semillas por si mismas vuelven a germinar y desarrollarse casi sin atención (NRC, 1984).

Morfología

La semilla de amaranto es de forma lenticular, con un diámetro de 1 a 1.5 mm y un gramo puede contener de 1000 a 3000 semillas. La semilla tipo grano generalmente tiene colores pálidos, pero el color puede variar desde blanco hueso a beige, café claro, rojo y negro. El embrión (germen) circunda al perispermo (Fig. 1.1). La envoltura de la semilla y el perispermo se encuentran unidos firmemente el uno

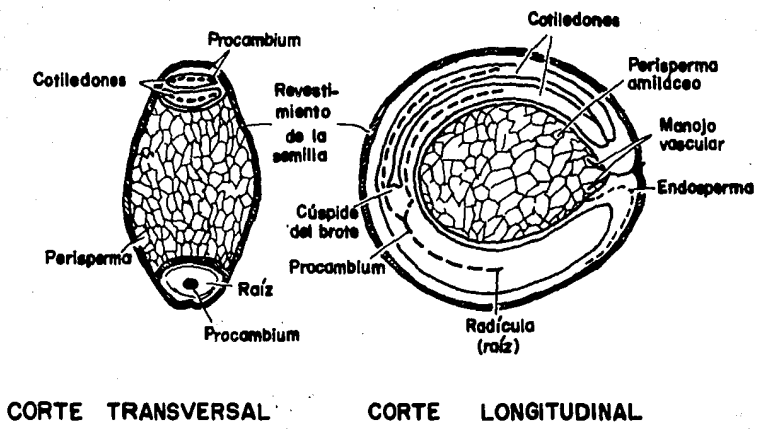


Fig. 1.1. Cortes de la semilla de amaranto que muestran su morfología (Irving et al., 1981).

al otro (Irving et al., 1981) pero pueden separarse por molienda abrasiva (Betschart et al., 1981). El revestimiento de la semilla es una capa delgada y única, cuya porción exterior contiene el pigmento que imparte color a la semilla (Becker y Saunders, 1984). Las partículas protéicas se localizan en el embrión y endospermo. En el endospermo estas partículas miden entre 1.5 y 2 μm de diámetro, mientras que en el parenquima del embrión es de 3 a 5 μm . En el perispermo la proteína se presenta en forma de depósitos entre los pequeños gránulos amiláceos, que son de 0.75 a 1.25 μm de diámetro.

Composición Química y Valor Nutritivo

La composición de la semilla de amaranto varía principalmente a causa de las prácticas agronómicas. La mayoría de los investigadores (Becker et al., 1981; Sánchez-Marroquín, 1983; NRC, 1984; Teutonico y Knorr, 1985) han observado la siguiente composición:

Proteína	12	-	16%
Lípidos	6	-	7.5
Almidón	62	-	69
Azúcares totales	2	-	3
Cenizas	3	-	3.5
Fibra	4	-	7.2
Vitaminas	1.0	-	1.5

El almidón es el carbohidrato más abundante de la semilla de amaranto y está constituido principalmente por amilopectina, con sólo un 56.7% de amilosa.

Los ácidos grasos del amaranto están constituidos en un 76% por los ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2), y palmítico (C16:0); 20% de ácido esteárico (C18:0) con trazas de linolénico (C18:3) y 4% de escualeno; contiene además cantidades traza de esteroles y ésteres de esterol (Becker et al., 1981; Anónimo, 1983; Bressani, 1983; NRC, 1984).

El contenido mineral de las especies de amaranto generalmente es más alto que el de los cereales de consumo tradicional, con prevalencia de fósforo, magnesio, potasio, calcio y hierro precisamente en ese orden. Estudios de molienda han demostrado que las cenizas están concentradas en un 66% en el revestimiento de la semilla y en la fracción del germen. La envoltura es rica en calcio, sodio y manganeso, mientras que el hierro y cobre están concentrados en el germen (Becker y Saunders, 1984).

La semilla de amaranto es rica en vitamina C, niacina y vitaminas B₁ y B₂ además de β -caroteno. (Teutonico y Knorr, 1985).

El amaranto contiene factores antinutricionales, como inhibidores de tripsina, polifenoles y saponinas (actividad hemolítica) que aunque su concentración es relativamente baja y similar a las presentes en leguminosas, si no son eliminadas antes del consumo, el valor nutritivo disminuye considerablemente. (Corrêa y Jokl, 1984; Calderón de la Barca et al., 1985). Afortunadamente estos factores son termolábiles y el proceso de cocción parece ser el adecuado para su eliminación (Becker y Saunders, 1984; Bressani, 1983).

Calidad Protéica

Los cortes anatómicos y las técnicas de molienda han sido usadas para demostrar que la proteína de A. cruentus está distribuida en un 65% en la envoltura de la semilla y el germen, y 35% en el perispermo amiláceo (Irving et al., 1981; Becker y Saunders, 1984; Sánchez-Marroquín, 1985a).

Para el A. caudatus el factor de conversión de nitrógeno a proteína es 5.85; en otras especies de amaranto los factores de conversión a proteína varían entre 5.2 y 5.6 (Becker y Saunders, 1984). Sin embargo, la NRC (1984) considera adecuado para cualquier especie de amaranto el factor 5.85.

La semilla de amaranto contiene un nivel promedio más alto de proteína que la mayoría de los granos de uso convencional. Su contenido de lisina, (Tabla 1.1), es casi tres veces mayor que el de maíz, y casi el doble del que contiene el trigo, de hecho el contenido de este amino ácido en el amaranto es similar al de la leche (NRC, 1984). La proteína de amaranto es excepcional porque su balance de amino ácidos es cercano al balance óptimo requerido por el humano, por lo tanto, suplementa a los cereales convencionales que son deficientes en lisina y aunque la proteína de amaranto se ha encontrado limitante en leucina, este amino ácido se encuentra en exceso en los demás cereales (Becker et al., 1981; Betschart et al., 1981; Sánchez-Marroquín, 1983; NRC, 1984; Teutonico y Knorr, 1985). No obstante, de trabajos realizados por otros autores como Martine de Lespinnasse (1979), Tovar y Carpenter (1982) y Bressani (1983), se puede deducir que no es la leucina el limitante, a juzgar por los aminogramas por ellos

Tabla 1.1 Contenido de lisina y cuenta química en proteínas de diversos alimentos.

Alimento	% de lisina	cuenta química ¹
Amaranto	5.5 - 6.21 ²	75 - 87
Leche en polvo	7.9 ³	72
Trigo	3.4 ⁴	57
Arroz	4.4 ⁴	--
Cebada	3.6 ⁴	62
Maíz	2.8 ⁵	44
Maíz opaco-2	3.9 ⁵	--
Maíz harinero-2	3.3 ⁵	--
Sorgo	1.04 ⁶	48
FAO (1973)	5.5	100

¹Keith, 1979

²Tovar y Carpenter, 1982; Sánchez-Marroquín, 1983; NRC, 1984.

³Bruner, 1976

⁴Kakade, 1974

⁵Hansel, 1973

⁶Tovar et al., 1984

reportados, duda que aún persiste. Sin embargo, se ha propuesto que el triptofano pudiese ser el amino ácido limitante (Martine de Lespinasse, 1979), pero Tovar y Carpenter (1982), Sánchez-Marroquín et al. (1985c) e inclusive en el presente trabajo, observamos que el triptofano se encuentra en niveles aún más elevados que en la leche, y con respecto a otros amino ácidos esenciales presentes en la proteína del amaranto, no se han encontrado deficiencias. Cuando se elabora una mezcla del 50% de harina de amaranto con 50% de harina de maíz, la combinación resultante satisface los requerimientos de aminoácidos esenciales para el humano, lo que es importante cuando se piensa en el enriquecimiento de productos como la tortilla (Sánchez Marroquín, 1983; Tovar y Carpenter, 1982; NRC, 1984; Sánchez-Marroquín y Maya, 1985b). La relación de eficiencia protéica (PER) para el grano cocido es similar al de caseína que es de 2.5, con una digestibilidad del 90.0% y un valor biológico (BV) de 75 que es cercano al balance ideal de amino ácidos esenciales que teóricamente es de 100.0 (NRC, 1984).

Elaboración Tradicional del Dulce de "Alegría"

En los estados de México y Morelos, sigue siendo importante el cultivo del amaranto; particularmente en Tulyehualco, Distrito Federal, debido a que gran parte de sus habitantes se ocupan de la elaboración de la "alegría". Las semillas cosechadas a finales de octubre, se secan durante 2 ó 3 días al sol. Después, se limpian con una serie de mallas especiales (Grubben, 1975). Posteriormente la semilla

se revienta sobre un comal de barro calentado con fuego de leña. La semilla así tratada se mezcla con miel o melaza y se comprime en bloques en cajones especiales para ser vendida en barras (NRC, 1984).

Importancia de la Evaluación del Valor Nutricional de Semillas Reventadas de Amaranto por un Método Industrial

Como ya se ha indicado, el amaranto es una fuente excepcional de lisina y los valores que se han obtenido de este amino ácido van de 5.0 a 6.2 g/100 g de proteína (Downton, 1973; Carlsson, 1980; Sánchez-Marroquín, 1980; Senft, 1980; Tovar y Carpenter, 1982). Se sabe por experiencia que el reventado es uno de los procesos más utilizados para hacer del amaranto un alimento atractivo, con propiedades físicas diferentes al amaranto crudo y además con un sabor muy agradable. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta el aspecto nutricional, esto es, la observación de si los procesos aplicados al amaranto por cocción o reventado, alteran su valor nutritivo, y de ser así, buscar condiciones alternas de procesamiento que permitan retener tanto como sea posible el valor nutritivo de la semilla. Se está tratando en algunos países de industrializar el grano y con este fin en México, un grupo de investigadores del Departamento de Alimentos de la Facultad de Química de la UNAM, auspiciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, ha iniciado un proyecto de esta naturaleza. El trabajo descrito en esta tesis pretende cubrir los aspectos químico-biológicos del proyecto.

Se intenta la producción industrial de "alegrías" con una pérdida

mínima en su contenido nutricional, pero el procesamiento de la se milla puede - si las condiciones del mismo no son adecuadas - deteriorar su calidad nutritiva, i.e. el procesamiento térmico induce ciertas reacciones de algunos amino ácidos como la lisina con los carbohidratos presentes en el alimento, o cuando el tratamiento térmico es muy severo se pueden incluso racemizar los aminoácidos de las proteínas presentes en el alimento (Hayase et al., 1975). Por esta razón, se hace indispensable que, aunado al esfuerzo ing nieril para desarrollar un proceso industrial, se tomen en cuenta las alteraciones nutricionales, en caso de que ocurran a la semilla sometida a procesamiento, de manera que se minimice hasta donde sea posible, la pérdida del valor nutritivo o utilizar procesos indus triales alternos, si esto fuera necesario.

Con el objeto de lograr una producción industrial de "alegrías", que implique una pérdida mínima en su contenido proteico, se evaluó el efecto del tratamiento térmico en la calidad nutritiva de las "alegrías" tradicionales vs "alegrías" reventadas mediante un sistema de lecho fluidizado, adaptado a un secador de espreas desarrollado por el grupo ingenieril del equipo de trabajo. Método en el que se aplicó un flujo de aire caliente con el fin de provocar el reven tado de la semilla, pero procurando evitar que la semilla se tostase.

Una aplicación muy interesante e importante en México, sería la de enriquecer la tortilla con semilla de amaranto (Tovar y Carpenter, 1982) siempre y cuando el producto así obtenido cumpla con

las especificaciones dadas en normas oficiales. De acuerdo a Sánchez-Marroquín (1980), el mejor procedimiento es el de nixtamalizar los granos de amaranto previamente, ya que la textura de la masa y las tortillas mejora y el valor nutritivo se eleva al aumentar la digestibilidad, el contenido de calcio, proteína y grasa. Una alternativa que pudiera funcionar y que se propone en este trabajo sería el utilizar la harina de semilla reventada en vez de nixtamalizarse junto con el maíz, de manera semejante a la propuesta por Sánchez-Marroquín (1985b).

Repercusiones Nutritivas en el Amaranto Sometido a Diferentes Procesos, y Alternativas de Procesamiento

En Guatemala, Bressani en 1984 aplicó tres diferentes procesos térmicos llegando a los siguientes resultados:

- a) Mediante cocción del grano a 96°C y secado posterior a 60°C con aire caliente, observó una calidad proteica superior de la semilla cocida y seca contra la de la semilla cruda, encontrando de la primera, un valor relativo a caseína de 72.2%.
- b) En un segundo proceso, llevo a cabo una cocción a presión atmosférica de las semillas y posteriormente una deshidratación de éstas con rodillos calentados mediante vapor a 60 lb de presión. En este caso también aumentó la calidad proteica del producto, observándose además que fue indiferente el empleo de aire caliente para la deshidratación o el uso para este fin de los rodillos antes mencionados.

c) En este último proceso, las semillas se pusieron en contacto con una superficie caliente a 180°C por 5 ó 10 seg, reventando casi el 100% de la muestra. Posteriormente se sometió a evaluación biológica en forma de harina, para evaluar su digestibilidad y lisina disponible. Se encontró que el producto reventado fue inferior en calidad nutritiva en relación al producto crudo, disminuyéndose además el NPR (retención neta de proteína), crecimiento y digestibilidad proteica. La explicación de este efecto dada por el autor, reside en la lisina disponible que sufre una reducción del 36.0% por el proceso térmico al que fue sometida.

Con el propósito de confirmar el efecto del reventado sobre la lisina disponible, se suplementaron dietas con lisina para ser evaluadas biológicamente. La adición de lisina logró reestablecer la calidad proteínica del grano, aún cuando el grano adicionado de lisina se sometió a reventado. Este autor concluye que... "estos estudios deben realizarse con más detalle y con mejores condiciones de procesamiento para mantener la calidad del producto, ya que, como se indicó, este proceso es el más común para transformar al amaranto en un producto alimenticio".

Martine de Lespinasse en 1979 había informado que el contenido de lisina en la semilla reventada-tostada era de 3.79 g/100 g de proteína, valor que comparado con los encontrados en la literatura representa una reducción del 24.0 al 37.0% del aminoácido. Por su

parte, Tovar y Carpenter (1982) detectaron en la semilla de amaranto reventado-tostado una reducción del 30.0% en la lisina-reactiva con respecto a la semilla cruda, además encontraron que en la semilla reventada, la proteína se racemizaba con 5.0 al 15.0% de alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y fenilalanina. Además observaron un contenido de triptofano de 1.55 g/16 g de N.

Ya en 1981 en Berkeley, Betschart et al. habían reventado la semilla de A. cruentus mediante el contacto con aire caliente sin encontrar diferencia significativa en el valor nutricional de las semillas así tratadas respecto al grano control con un PER de 1.7 y digestibilidad aparente de nitrógeno del 77.0%. Sin embargo, observaron que había una disminución de lisina total del 15%.

Los estudios anteriores han llevado a proponer métodos alternos que mantengan la calidad nutritiva del amaranto. El contacto entre el grano y una superficie caliente, además de inducir el reventado, provoca el tostado del producto, lo que da por resultado una disminución en la calidad nutritiva. Es por esta razón que se ha propuesto (Bressani, 1984) reventar el grano por medio de una corriente de aire caliente que minimice ese tiempo de contacto provocando sólo el reventado. En estudios adicionales realizados por el mismo autor, se encontró que con este proceso la semilla mejora en valor nutritivo a diferencia de cuando se somete al de reventado-tostado.

Lisina Total, Lisina Disponible y Lisina-Reactiva

Eldred y Rodney en 1946 observaron, en sistemas modelo de caseína

glucosa relativamente secos, que los grupos ϵ -amino de lisina reaccionan con los grupos carbonilo de azúcares reductores, dando origen a compuestos que no tienen valor nutricional pero que pueden regenerar a la lisina después de una hidrólisis con ácidos fuertes. Los valores de lisina obtenidos de esta manera se cuantifican como lisina "total", pues toma en consideración toda la lisina contenida en la proteína analizada, aunque ésta se haya condensado con azúcares de donde se libera finalmente por HCl 6.0 N, para su posterior cuantificación.

Estos compuestos amino-azúcar no son nutricionalmente disponibles; por lo que se ha tratado entonces de encontrar métodos de análisis que no incluyan en su medición estos compuestos. Por lo que el término "lisina disponible", de acuerdo a Carpenter (1973), deberá aplicarse a la lisina que el animal ó el humano utilizan para el mantenimiento o desarrollo de tejido. Las pruebas directas de la potencialidad de los alimentos como fuentes de "lisina disponible", involucran pruebas biológicas de desarrollo en animales usando como fuente de lisina a la proteína en cuestión. Se ha intentado medir la disponibilidad de lisina usando para este fin el desarrollo de pollos, sin embargo, éstos llevan mucho tiempo y son muy costosos, por lo tanto, se ha pretendido desarrollar ensayos químicos y microbiológicos con el objeto de establecer análisis rápidos que puedan utilizarse como rutinarios. Carpenter y Ellinger (1956) mostraron que el análisis químico de los grupos ϵ - amino de

lisina, libres o enlazados químicamente, se correlacionaban mejor con la disponibilidad nutricional de lisina en el desarrollo de pollos que la lisina total; denominándosele a esta determinación "lisina-reactiva" (Boctor y Harper, 1968; Carpenter, 1973) para distinguirla de la cuantificación netamente biológica. A pesar de estas explicaciones dadas por los autores, a menudo se utilizan ambos términos indistintamente, pero en realidad se debe utilizar el término "lisina-reactiva" en lugar de "lisina disponible" cuando se analiza químicamente, puesto que en las proteínas las fracciones que son parcialmente indigeribles pueden incluir algo de lisina reactiva que nutricionalmente no es disponible.

Utilidad del Método DBC para la Evaluación de Lisina-Reactiva

Chatterjee y Abrol en 1977 utilizaron el método "capacidad de colorante ligado" ó "dye binding capacity" (DBC), para evaluar la calidad protéica de granos de cebada sometidos a reventado, recomendando el valor DBC como índice de la pérdida de disponibilidad de aminoácidos; método que tiene además la ventaja de ser más rápido y barato que los métodos de evaluación biológica. Sus argumentos los basaron en el hecho de que encontraron una reducción del 2 al 6% en la proteína de cebada reventada medida por DBC. Mediante análisis de aminoácidos confirmaron que la disminución de proteína se debió a un daño en los aminoácidos de la misma, que además fue irreversible, al observar una menor recuperación de los aminoácidos después de la hidrólisis ácida de los granos reventados.

Los aminogramas revelaron cuentas químicas para estos granos de 55 a 73, teniendo como principal aminoácido limitante a la lisina. Sin embargo, el estudio no se completó con una evaluación biológica de los mismos granos reventados y sin reventar de cebada, que evaluaran la posible correlación de los valores DBC en relación a la calidad protéica in vivo y quedar completamente convencidos de que el método DBC pudiera ser una alternativa rápida y barata de estimación de la calidad protéica de un alimento.

El trabajo anterior, aunado al método desarrollado por Hurrell et al. (1979) para lisina-reactiva por el método "colorante ligado a lisina" (DBL) y al hecho de que diferentes autores como Martine de Lespinasse en 1979, Tovar y Carpenter en 1982 y Bressani en 1984, informaron un descenso de lisina en el amaranto, sometido a reventado por contacto directo del 30 al 37% con respecto a la semilla cruda, y aún más, que Tovar y Carpenter (1982) midieron lisina-reactiva por el método DBL en A. hypochondriacus sometido a reventado-tostado, *hicieron pensar que podría encontrarse una correlación entre la lisina-reactiva medida por el método DBL y la evaluación biológica del amaranto procesado con fines de monitoreo a nivel industrial.*

OBJETIVOS

Puesto que se pretende industrializar la operación del reventado de la semilla de A. hypochondriacus por métodos alternos, diferentes al reventado tradicional pero obteniéndose un producto con

las mismas características e igual sabor sin desdeñar el factor nu
tricional, se ha planteado una hipótesis para este trabajo, en la
que se supone que la lisina presente en las proteínas de A. hypochon-
driacus es más susceptible a dañarse y por lo tanto hacerse menos
utilizable, si se emplea para su reventado el método tradicional
(por contacto directo) que si se usa, para el mismo fin, un flujo
de aire caliente. En este último caso, se espera que la lisina-
reactiva y "disponible" no disminuya significativamente, si se com
para con aquellas de la semilla cocida y deshidratada en condicio-
nes suaves.

Las preguntas que pretendo responder y los objetivos de esta
tesis son los siguientes:

- a) ¿Cuál es el porcentaje de semilla reventada y cuál de semilla
tostada, cuando se le somete a tratamiento térmico directo?
- b) ¿Qué fracción de la semilla (reventada o tostada) contribuye
en menor medida en la disminución de lisina?
- c) Cuantificar la eficiencia del reventado, tanto en el método
tradicional como en la semilla procesada por lecho fluidizado.
- d) Evaluar el posible daño que la lisina pueda sufrir, ya sea en
la semilla reventada o en la semilla tostada, por los dos dig
tintos métodos de reventado térmico.
- e) Observar si existe correlación entre la disponibilidad de li-
sina in vivo en las semillas de amaranto cocido y reventadas
con los diferentes métodos térmicos, utilizándose para dicho

fin ratas como modelo experimental vs la evaluación de lisina reactiva por el método DBL.

- f) Evaluación de lisina reactiva y disponibilidad in vivo en una suplementación de harina de nixtamal-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50), en base a los niveles recomendados por el Instituto Nacional de Nutrición (Rivas, 1985), con fines de elaboración posterior de un producto si resulta de ca lidad nutritiva apreciable.
- g) Observar el efecto que sobre la digestibilidad tienen los diferentes procesos térmicos a los que son sometidas las semillas de A. hypochondriacus.
- h) Indirectamente, corroborar si efectivamente la leucina es el principal aminoácido deficiente en la proteína del amaranto.

CAPITULO II

EFECTOS QUIMICO-BIOLÓGICOS EN ALIMENTOS RICOS EN

PROTEÍNAS TRATADAS TÉRMICAMENTE

DETERIORO DE PROTEÍNASInfluencia del Calor sobre la Composición Química y Calidad Nutri-
tiva de las Proteínas

Los cambios químicos que sufren las proteínas cuando se someten a un tratamiento térmico, pueden dividirse de acuerdo a Finley (1985) en cuatro categorías:

1. El cambio que sufren las proteínas en su estructura terciaria, debido a un tratamiento térmico ligero que no implica ningún efecto nutricional adverso. Estos cambios influyen en la funcionalidad de la proteína, i.e., pérdida en la solubilidad, o si se trata de una enzima, reducción o eliminación de su actividad, viscosidad, propiedades osmóticas, movilidad electroforética, inmunosensibilidad y sensibilidad química. Este tratamiento puede también mejorar o destruir las propiedades funcionales de un alimento; e.g., destruye inhibidores de enzimas, como los inhibidores de tripsina que son desnaturalizados por el calor. El glúten puede perder sus propiedades de panificación, muchos de estos cambios no afectan considerablemente la calidad nutricional de las proteínas.
2. Este tipo de daño se asocia a la reactividad de los grupos básicos de la proteína con los carbohidratos (reacción de Maillard),

que se explicará con detalle más adelante, en la cual los primeros estados de la reacción hacen particularmente no disponible a la lisina, además de afectar su solubilidad y el color por formación de pigmentos oscuros (melanoidinas).

3. El tercer tipo de cambio es el resultado de un tratamiento térmico más severo. Particularmente la lisina y cistina son sensibles a este tipo de descomposición térmica. La lisina y arginina reaccionan con amidas ó grupos carboxílicos libres de cadenas laterales entrecruzándolas, impidiendo su digestión y afectando su funcionalidad. A su vez, la cistina puede ser transformada a dimetil disulfuro, entre otros productos, cuando se somete a temperaturas de 115°C. Otros aminoácidos pueden reaccionar con cistina, metionina o histidina. También se puede formar una lactona entre el grupo carboxilo terminal y los hidroxí aminoácidos.
4. La cuarta categoría se puede observar en el tostado superficial de los alimentos. El resultado es pues la racemización de los aminoácidos de las proteínas, o si el tratamiento térmico continúa, puede provocar la destrucción completa de los aminoácidos. En general, la cocción incrementará la digestibilidad de las proteínas, sin embargo, en algunos casos, el calor excesivo puede reducir el valor nutritivo de las proteínas (Hurrell y Carpenter, 1977).

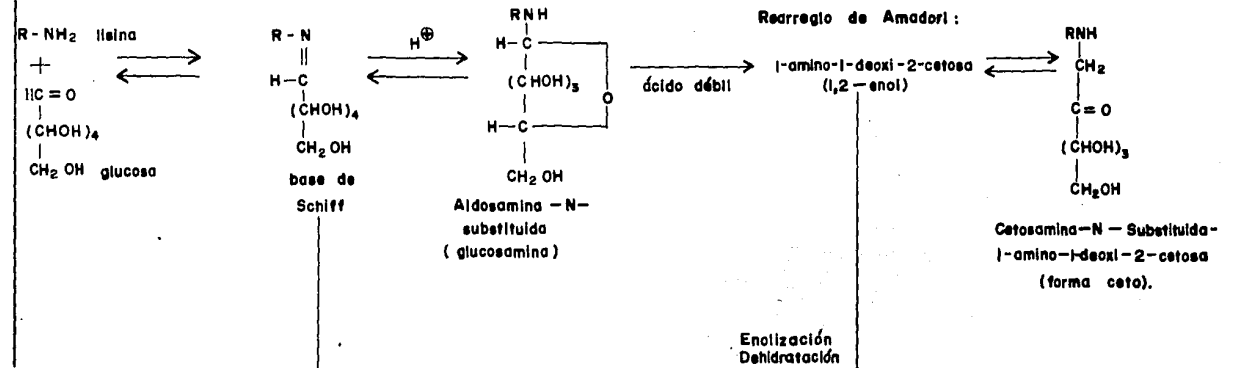
Reacciones de Maillard. (Obscurecimiento no Enzimático)

Estas reacciones se caracterizan por la interacción de las proteínas, principalmente los grupos ϵ -amino de lisina y los grupos carbonilo de azúcares reductores y pueden llevarse a cabo aún durante el almacenamiento de diversos alimentos a temperatura ambiente, se resumen en la Fig. 2.1

Las reacciones de Maillard poseen energía de activación relativamente alta. De este modo, cuando los alimentos contienen azúcares reductores y si éstos son calentados ligeramente, las reacciones de Maillard aparecen preferentemente a cualquier otro tipo de daño protéico. Si las proteínas de alimentos son sometidas a calentamientos más severos en presencia de cantidades pequeñas de azúcares reductores (e.g., tostado de cereales), pueden sufrir daño por reacciones de Maillard, además de entrecruzamiento proteí_na-proteína. En tales condiciones, no solo habrá una pérdida en la disponibilidad de lisina en los alimentos, sino también una disminución en la digestibilidad total del nitrógeno de las proteínas y por lo tanto, en la disponibilidad de muchos aminoácidos (Miller et al., 1965).

La sacarosa, azúcar no reductor, inducirá las reacciones de Maillard solo que sea invertida a glucosa y fructosa por calentamiento ó por hidrólisis espontánea en medio ácido. Sin embargo, los pH bajos inhiben parcialmente las primeras reacciones de Maillard, que consisten en la condensación de grupos carbonilos con grupos ϵ -

1.- Fase preliminar de las reacciones de Maillard.



2.- Fase final de las reacciones de Maillard.

Transaminación
 ↓
 Oxodido + Amino azúcar
 ↓
 Degradación de Strecker
 ↓
 Últimos estados del oscurecimiento

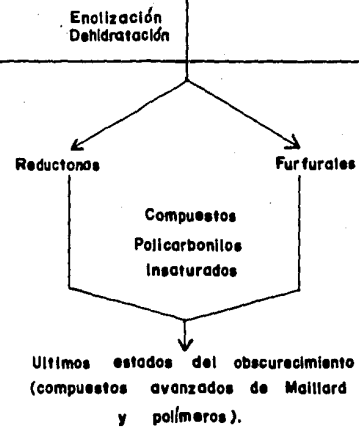


Fig. 2.1. Esquema simplificado de las reacciones de Maillard (Tannenbaum, 1979).

amino no ionizados. El pH alcalino generalmente favorece las reacciones de Maillard.

Desde el punto de vista nutricional, las reacciones iniciales de Maillard deben considerarse por separado a las reacciones finales, puesto que ambas no inducen el mismo tipo de daño. Sin embargo, los dos tipos de reacciones pueden efectuarse casi simultáneamente en el mismo alimento.

Reacciones Iniciales de Maillard (Azúcar-Amino)

Como ya se indicó anteriormente, se ha observado que aún bajo condiciones benignas de calentamiento y durante el almacenamiento prolongado de alimentos proteícos, se pueden efectuar las reacciones de Maillard entre los grupos ϵ -amino de lisina y los grupos aldehído de los azúcares. Después de un calentamiento ligero, la lisina es el único aminoácido que reduce su disponibilidad significativamente con una pequeña reducción en la digestibilidad del nitrógeno (Carpenter, 1973; Hurrell y Carpenter, 1977; Mauron, 1981). El valor nutricional de lisina en forma de glucosilamina no se conoce del todo bien, puesto que las glucosilaminas son completamente inestables y sufren arreglo de Amadori (Fig. 2.1). Se supone que, cuando se somete a hidrólisis con HCl, toda la lisina de glucosilaminas se regenera a lisina libre (Mauron, 1972). Los productos de Amadori (monodeoxicetosisilisina) son los principales derivados de lisina en alimentos o proteínas modelo que sufren reacciones iniciales de Maillard. El compuesto sintético ϵ -N-(1-deoxi-D-fructo

sil)-L-lisina, correspondiente a la reacción de glucosa con lisina, no es disponible para la rata como fuente de lisina, se absorbe completamente en el intestino pero se excreta posteriormente en la orina (Finot, 1973). En sistemas modelo glucosa-proteína, el ϵ -N-(deoxifructosil) lisina parece ser que se libera parcialmente durante la digestión in vitro, si fuese in vivo, posteriormente sería absorbido y entonces excretado en orina en forma de péptidos indisponibles (Ford y Shorrock, 1971; Valle-Riestra y Barnes, 1970; Pronczuk et al., 1973). Esto explicaría parcialmente la alta digestibilidad protéica observada frecuentemente en proteínas dañadas por obscurecimiento no enzimático, con muy bajo contenido de lisina disponible (Finot, 1973). Los ϵ -N-(deoxicetosil)-lisil péptidos se ha encontrado que son parcialmente metabolizados por la flora intestinal.

Parece ser que, debido a un impedimento en la acción hidrolítica de tripsina, solo el 10% de las unidades de lisina substituidas en el grupo ϵ -amino con el azúcar se liberan de la cadena protéica. Una vez liberados los compuestos ϵ -N-(deoxicetosil)-lisil péptidos, pueden ser absorbidos por difusión pasiva, pero a pesar de ello, no son utilizados pues posteriormente se excretan en la orina, mientras que la cantidad que no se absorbió puede degradarse por la microflora del colon (Finot, 1973; Tannenbaum, 1979). Esta degradación puede explicar también la alta digestibilidad de proteínas en la primera fase de las reacciones de Maillard (Nesheim y Carpenter, 1967).

Reacciones Finales del Obscurecimiento no Enzimático

Cuando el tratamiento térmico es más severo, el daño a lisina aparece en presencia o ausencia de carbohidratos. En presencia de carbohidratos, las reacciones de Maillard pasan de la forma de oxietosil a la forma de pigmentos o melanoidinas, ésto no solamente afecta la disponibilidad de lisina, sino también la disponibilidad de todos los aminoácidos y por lo tanto la digestibilidad de la proteína completa. Las reacciones avanzadas de Maillard pueden destruir grandes cantidades de lisina y arginina y, en menor grado, triptofano, cistina e histidina (i.e., que no se recuperan por hidrólisis de la proteína). También pueden reducir la hidrólisis enzimática de todos los aminoácidos in vivo ó in vitro (Evans y Butts, 1949; Miller et al., 1965; Hurrell y Carpenter, 1977).

En los estados más avanzados del obscurecimiento no enzimático, los compuestos policarbonilos insaturados, tales como las reductonas (Fig. 2.2), se forman de los azúcares reductores. Estos compuestos reactivos se polimerizan y se unen simultáneamente a grupos amino α -terminales y a grupos ϵ -amino de diferentes cadenas polipeptídicas, produciendo polímeros proteína-carbohidrato altamente entrecruzados de alto peso molecular, coloridos, con baja solubilidad, digestibilidad y valor nutritivo. Clark y Tannenbaum (1974) determinaron la estructura y el peso molecular de los "péptidos límite" que son los polímeros de carbohidratos y péptidos entrecruzados. Los compuestos policarbonilos probablemente se unen a arginina, histidina, serina y

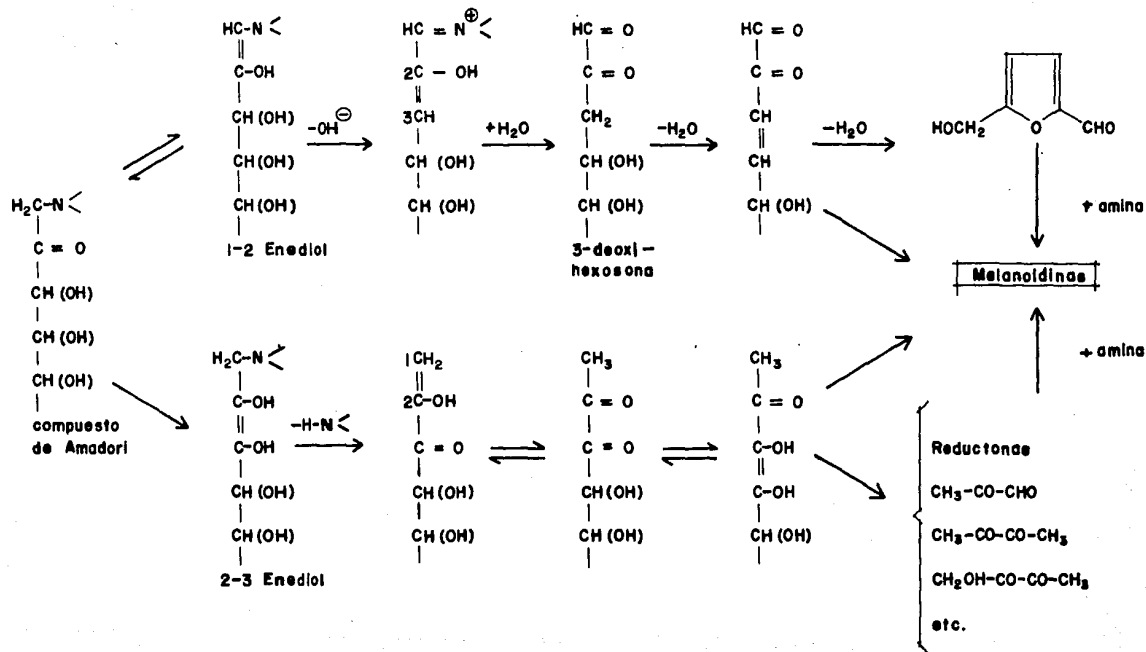


Fig. 2.2 Degradación de los compuestos de Amadori (Hodge, 1953).

triptofano. Los "péptidos límite" pueden contener varios aminoácidos esenciales, incluyendo lisina con grupos ϵ -amino libres, que pueden ser indisponibles in vivo. Esto explicaría porqué se reduce el valor nutritivo de las proteínas en un estado avanzado de reacciones de obscurecimiento. Además, varios aminoácidos y no exclusivamente la lisina, pueden hacerse indisponibles (Valle-Riestra y Barnes, 1970; Boctor y Harper, 1968).

Se ha sugerido también que el impedimento del entrecruzamiento a la hidrólisis enzimática, reduce la velocidad de digestión de la proteína. Sin embargo, la reducción en la digestibilidad no siempre explica la disminución en el valor nutritivo de la proteína. Aún cuando exista destrucción de lisina, ésto no explica necesariamente su baja disponibilidad, pues es posible que sea absorbida en una forma no metabolizable y excretada en la orina, aunque también la formación de sustancias tóxicas puede contribuir a reducir el valor nutritivo de los alimentos que contienen productos de la reacción de Maillard (Carpenter, 1973; Hurrell y Carpenter, 1977; Mauron, 1981).

La hidrólisis ácida de proteínas severamente dañadas, regenera mucho menos lisina que en las primeras fases de las reacciones de Maillard. Además, durante los últimos estados del obscurecimiento no enzimático, se involucra la degradación oxidativa de los aminoácidos (degradación de Strecker, Fig. 2.3) proveniente de la ruptura de las cadenas polipeptídicas por los α dicarbonilos y otros

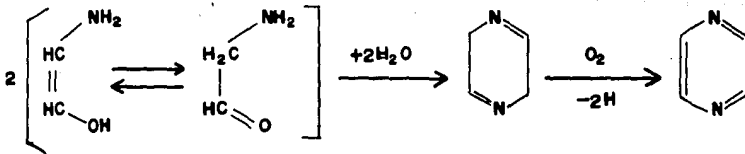
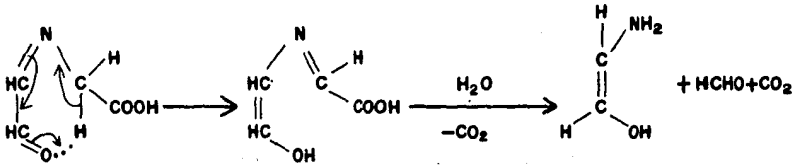
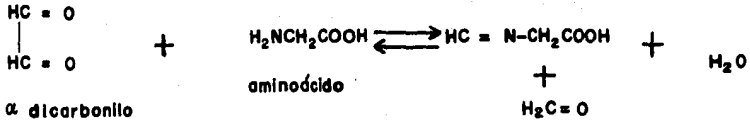


Fig. 2.3. Degradación de Strecker \longrightarrow pirazinas (Mauron, 1981).

compuestos dicarbonilos conjugados, producidos por el rompimiento de los compuestos de Amadori. En la degradación de Strecker, los aminoácidos reaccionan con los α -dicarbonilos para formar bases de Schiff, que se enolizan en sus derivados de los aminoácidos para ser descarboxilados. La nueva base de Schiff, con un átomo de carbono menos, se hidroliza en la amina y el aldehído que corresponde al aminoácido original con un átomo de carbono menos (Tabla 2.1). El resultado neto es una transaminación, que será importante para la incorporación de nitrógeno a melanoidinas (Mauron, 1981).

Las reacciones finales del oscurecimiento no enzimático, se estudiaron en sistemas modelo de proteínas con azúcares reductores calentados o almacenados por largos períodos, así como en alimentos protéicos tratados térmicamente, especialmente en panes, galletas, pasteles y en cereales tostados o inflados. Estas reacciones son las responsables del color y sabor deseable de estos alimentos y por lo tanto, su efecto sobre el valor nutritivo, regularmente no se considera problemático, pues las temperaturas aplicadas no son severas. Es por esto que, se recomienda el control en la temperatura de horneado y el contenido de azúcar, de manera que se evite una disminución en la disponibilidad de lisina. Al suplementar con lisina estos productos, la pérdida del aminoácido es similar (Tannenbaum, 1979).

**Tabla 2.1 Formación de aldehídos durante la degradación
de Strecker**

Aminoácido	Aldehído
Alanina	Acetaldehído
Glicina	Formaldehído
Isoleucina	2-Metilbutanal
Leucina	Isovaleraldehído
Metionina	Metional
Serina	Glioxal
Fenilalanina	Fenilacetaldehído
Treonina	2-hidroxipropanal

Reacciones Proteína-Proteína

En ausencia de azúcares reductores u otros compuestos carbonílicos, el daño térmico producido a la proteína se evalúa por la pérdida de lisina y disminución en su valor nutricional. Después de un tratamiento térmico realmente severo, o por un calentamiento prolongado o ambos, la lisina-reactiva y el valor nutritivo se reducen considerablemente. A diferencia de la reacción de Maillard, la lisina no se destruye y se recupera totalmente por una hidrólisis ácida, excepto la cistina. La principal razón por la que se reduce el valor nutritivo en tales materiales parece ser que se debe a una reducción en su digestibilidad. Se ha sugerido que el calor causa la formación de nuevos enlaces (entrecruzamientos) que resisten la acción enzimática, reduciendo así su digestibilidad y la biodisponibilidad de sus aminoácidos. De acuerdo al trabajo efectuado por Hurrell et al. (1976), la reducción en la calidad nutritiva de las proteínas tratadas térmicamente se debe al entrecruzamiento de las cadenas polipeptídicas, esto reduce su digestibilidad disminuyendo la biodisponibilidad de los aminoácidos de las proteínas, entre ellas la lisina, cuyo grupo ϵ -amino reacciona con los grupos amida de asparagina ó glutamina (Fig. 2.4). Se ha observado una caída en el contenido de lisina-reactiva en proteínas severamente tratadas con calor, ya que el reactivo fluorodinitrobenzeno (FDNB) no puede unirse a los grupos ϵ -amino de lisina ya enlazados. Se dice entonces que se forman isopéptidos, que es un

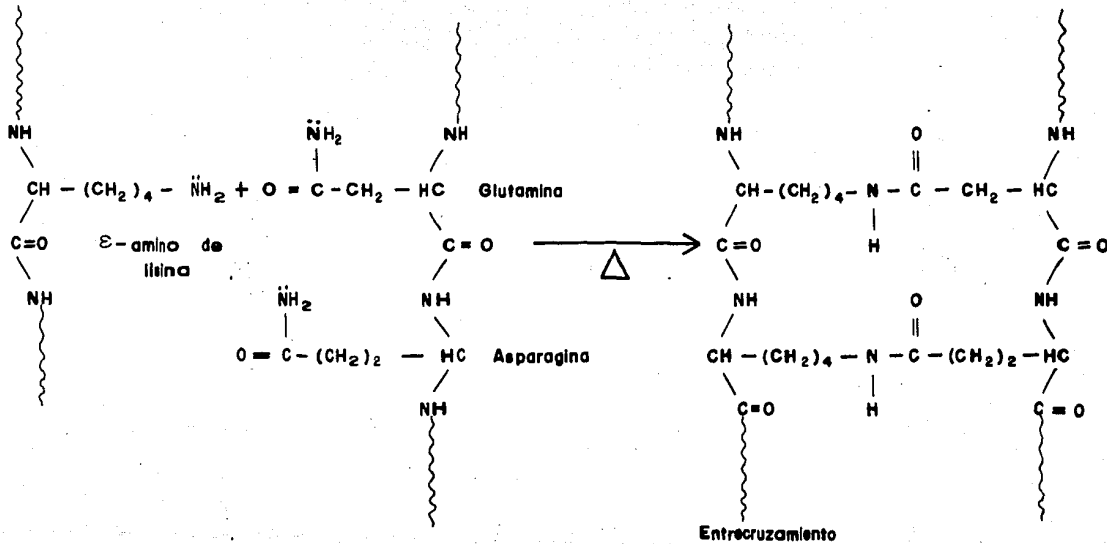


Fig. 2.4. Condensación de los grupos ϵ -amino de lisina y los grupos amida de glutamina y asparagina.

término que se utiliza para diferenciar estos enlaces del enlace peptídico. El entrecruzamiento también puede deberse a la degradación de cistina. El calor puede causar fisión de los enlaces disulfuro (Fig. 2.5), produciendo dehidroalanina que puede condensarse con cistina para formar lantionina, o con los grupos ϵ -amino de lisina para formar lisinoalanina (Carpenter, 1973; Hurrell y Carpenter, 1977; Mauron, 1981).

La lisina total que se recupera después de una hidrólisis ácida no se reduce aún después de 27 h de calentamiento en ausencia de carbohidratos, lo que indica que en ausencia de éstos la lisina no se destruye por calentamiento. Sin embargo, el entrecruzamiento reduce la velocidad de digestión de las proteínas, debido posiblemente a un impedimento enzimático o un bloqueo de los sitios de ataque enzimático. También aparece un descenso en el valor nutricional de la proteína y para explicarlo se ha sugerido que los aminoácidos pueden ser absorbidos en formas no metabolizables y excretados en la orina. La racemización es un posible mecanismo por el cual un aminoácido es modificado ópticamente y de esta manera se hace indisponible.

Los humanos no son capaces de utilizar muchos aminoácidos en forma D. Rose (1957) propuso que la D-metionina es tan efectiva como su isómero L, pero otros autores como Tovar y Schwass (1983) han considerado que la D-metionina contribuye sólo a las reservas de sulfato en lugar de ser convertida a L-metionina en el organismo.

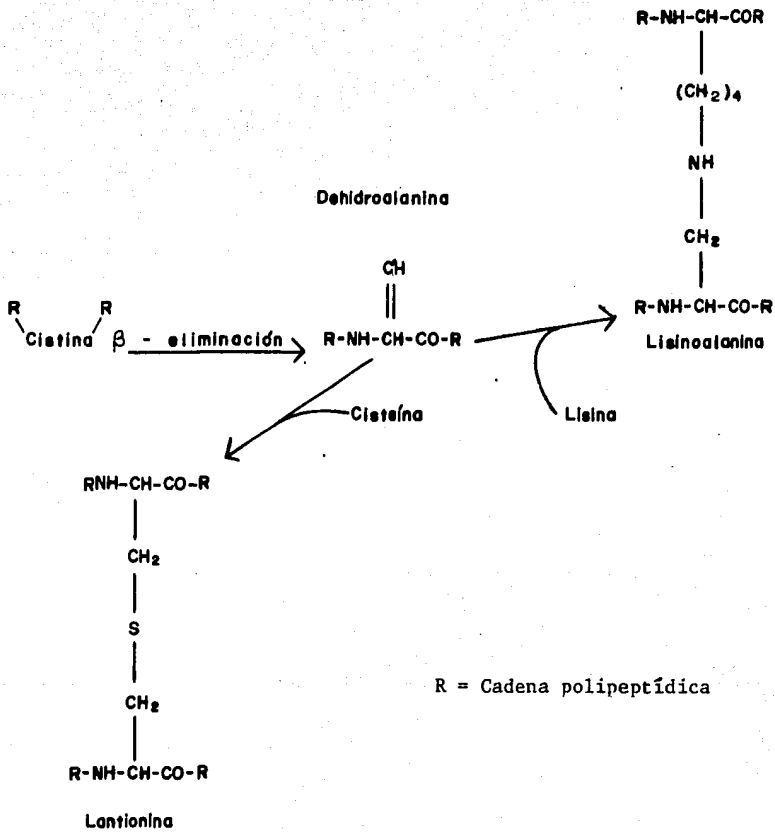


Fig. 2.5. Formación de lisinoalanina y lantionina (Finley, 1985).

Por otro lado, ambos autores coinciden en que la D-fenilalanina se aprovecha parcialmente en humanos, pero una mezcla de DL-fenilalanina es tan efectiva como el L-isómero sólo. Para otros D-aminoácidos se considera que éstos se excretan pues no son utilizados. Además, algunos como la D-serina se considera que causan lesiones en el riñón de ratas (Tovar y Schwass, 1983).

Los aminoácidos también pueden descomponerse térmicamente. Se ha reportado (Finley, 1985) que se forman radicales libres en las proteínas o en lisina calentada a 200°C por 22 min. Los radicales formados son estables en agua y jugos digestivos. Es posible pensar que similares reacciones tomen lugar cuando las proteínas alcanzan temperaturas equivalentes, aunque hay que tomar en cuenta que las reacciones de las proteínas se complican por la presencia de los enlaces peptídicos, el oxígeno y otros componentes de los alimentos. La lisina por ejemplo puede descomponerse térmicamente cuando se le somete a temperatura de 200 a 250°C por 1 h y 10^{-3} torr. La piperidina, piridina, pirrol y diversos productos derivados de estos compuestos han sido identificados de la descomposición de lisina por Lien y Nawar en 1974.

También debe considerarse la posible formación de productos tóxicos por la descomposición térmica de los alimentos. Sugimura y Nagao (1979) encontraron mayor actividad mutagénica en la superficie de carne y pescado cuando son asados, en comparación a la producida por el benzo (a) pireno obtenido de la pirólisis de la grasa. Esta observación condujo al descubrimiento de varios mutágenos de

origen proteico o de aminoácidos libres. Aminoácidos, como el triptofano, se han visto así involucrados pero es pertinente notar que estos compuestos se forman a temperaturas mayores de 300°C (Takayama, et al., 1979).

La investigación hasta aquí revisada sólo toma en cuenta los efectos del calor sobre las proteínas. Es difícil separar entonces los efectos del calor solo, de los efectos del calor en presencia de carbohidratos y oxidación de lípidos. En la Tabla 2.2 se resumen los tipos de degradaciones que se pueden observar en las proteínas a varias temperaturas cuando únicamente son tratadas térmicamente.

Adicionalmente, cuando se estudió el efecto del tratamiento térmico en la caseína, se sugirió que a altas temperaturas los aminoácidos azufrados pueden oxidarse a formas no biodisponibles. En estudios in vivo e in vitro de caseína calentada y caseína calentada con glucosa, se perdieron triptofano y tirosina. Por su parte, la metionina se oxidó a sulfona y sulfóxido de metionina, mientras que la cisteína se oxidó a ácido cistéico, de los cuales sólo el sulfóxido de metionina puede ser biodisponible (Anderson et al., 1976). También se observó que la presencia de ácido cistéico en un péptido redujo la digestibilidad del polipéptido en la región correspondiente al primero (Pieniazek et al., 1975).

Es importante recalcar que la mayoría de estas reacciones no reflejan las condiciones que se alcanzan en el procesamiento normal de los alimentos, sin embargo, las proteínas alcanzan altas temperaturas generalmente

TABLA 2.2 Influencia del calor en las proteínas

Temperatura °C	Cambio o degradación
70 - 80	Rompimiento del enlace disulfuro. Abertura de las estructuras helicoidales. Precipitación de proteínas muy sensibles.
80 - 100	Desdoblamiento de la estructura protéica. Pérdida de enlaces disulfuro.
100 - 150	Descomposición de lisina. Pérdida de serina y treonina. Formación de isopéptidos. Formación de lisinoalanina.
200 - 250	Pirolisis de todos los aminoácidos. Racemización.
> 300	Formación por pirólisis de compuestos carcinogénicos.

en la superficie y ahí sí deben de considerarse. Es importante hacer notar que muchos de los productos de pirólisis son necesarios para la generación de olores y sabores en alimentos horneados y rostizados.

Isomerización

El tostado de proteínas también ha demostrado ser causa de racemización. Caseína, lisozima, poli(L-alanina), poli(L-ácido glutámico) y poli(L-lisina) han sido calentados a sequedad de 180 a 300°C por 20 min en atmósferas de nitrógeno o aire. El ácido aspártico, ácido glutámico, alanina y lisina fueron considerablemente racemizados a altas temperaturas. Los aminoácidos libres y los oligopéptidos formados de caseína tostada se encontraron también racemizados (Hayase et al., 1975). Nutricionalmente este efecto tiene consecuencias en la calidad de la proteína, ya que excepto para D-fenilalanina, los D-aminoácidos no son utilizados por el humano (Tovar, 1981; Tovar y Schwass, 1983). Los D-aminoácidos impiden el ataque al enlace peptídico de las proteasas, pepsina, tripsina y quimotripsina, que son estereoespecíficas (Satterlee y Chang, 1984), así mismo inhiben el transporte de L-aminoácidos en el tracto intestinal (Tovar y Schwass, 1983).

Reactividad de Hidroperóxidos de Lípidos con Proteínas y Aminoácidos

Las proteínas y aminoácidos también son susceptibles a dañarse con los hidroperóxidos provenientes de lípidos insaturados. Los

hidroperóxidos como sus productos de descomposición son potencialmente sustancias que pueden causar deterioro a proteínas y aminoácidos de los alimentos.

Karel et al., (1975) estudiaron la formación de radicales libres en las proteínas usando la técnica de resonancia espín electrón, utilizando como modelo las reacciones que toman lugar entre los hidroperóxidos del linoleato metílico con lisozima y otras proteínas o aminoácidos.

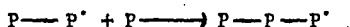
Con la técnica de resonancia espín electrón quedó establecido que las reacciones en estado seco entre los peróxidos provenientes de la oxidación del linoleato y lisozima produjeron radicales libres. De manera similar al aplicar radiación ionizante a proteínas con peróxidos de linoleato de metilo, produjeron radicales libres en átomos de carbono y en átomos de azufre, de los grupos sulfhidrilo de aminoácidos. Los productos derivados de las reacciones de distintos aminoácidos con peróxidos de lípidos tienen la característica de ser degradativos, porque los aminoácidos susceptibles a formar radicales libres estables también son vulnerables al ataque de otros radicales libres. Los aminoácidos histidina, cisteína, cistina, lisina y metionina dan diferentes productos por esta degradación vía radicales libres que se encuentran resumidos en la Tabla 2.3 (Gardner, 1979). La degradación de lisina puede explicarse por un ataque de radicales libres, ya sea en el carbón α ó los que se encuentran en la cadena carbonada, de los cuales el carbón

Tabla 2.3 Productos obtenidos después de la exposición de aminoácidos a peróxidos de lípidos

Aminoácido	Productos	Tipo de lípidos
Histidina	Imidazol-ácido láctico; imidazol-ácido acético; aductos histidina-aldehído (base de Schiff).	Peróxido de linoleato de metilo ó hidroperóxido de linoleato de metilo.
Cisteína	Histamina; valina; ácido aspártico; etilamina. H ₂ S; alanina; cistina. Cistina; ácido cisteico; disulfoxido.	Peróxido de linoleato de metilo. Peróxido de araquidonato de etilo. Peróxido de ácido linoleico.
Metionina	Sulfóxido de metionina.	Peróxido de linoleato de metilo.
Lisina	diaminopentano; ácido aspártico; glicina, alanina; 1,10-diamino-1,10-dicarboxidecano; ácido α -aminoadipico; ácido pipecolínico.	Peróxido de linoleato de metilo.

en posición ϵ parece ser el más lábil. Es de particular importancia hacer notar que hay formación de bases de Schiff con los productos secundarios de la descomposición de hidroperóxidos de lípidos (los aldehídos que se obtienen, entre otros productos) en particular el malonaldehído, por medio del cual se entrecruzan las proteínas vía bases de Schiff (Tovar y Kaneda, 1977) produciéndose obscurecimiento en el alimento donde se forman, además de alterar el sabor.

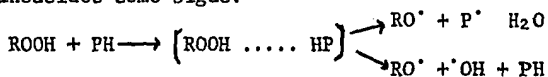
Entre las muchas consecuencias de la exposición de las proteínas con lípidos oxidados se encuentra la formación de complejos lípido-proteína, que se enlazan a través de fuerzas físicas. Cambios químicos causados por interacción de hidroperóxidos de lípidos y proteínas, como son: entrecruzamiento proteína-proteína, que ocurre de la siguiente manera:



y el entrecruzamiento, a través de las reacciones de terminación, cuando dos radicales protéicos interaccionan:



siendo el proceso de transferencia de radicales libres a proteínas y aminoácidos como sigue:



donde PH se refiere a proteínas y ROOH a los hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados (Gardner, 1979).

Métodos Químicos para Determinar Lisina-Reactiva

De ninguna manera debe suponerse que todos los aminoácidos, que se liberan para su cuantificación por hidrólisis de las proteínas de los alimentos con ácidos o alcalis, sean absorbidos y utilizados por el organismo cuando el alimento se ingiere.

Como se mencionaba anteriormente, un calentamiento severo a través de reacciones con carbonilos, ocasiona que la lisina de las proteínas en los alimentos se vuelva no disponible para animales como rata, pollo e inclusive el hombre. Sin embargo, el contenido total de lisina determinado después de una hidrólisis ácida, no se reduce tanto, el ϵ -N-(1-deoxi-D-fructosil)-L-lisina (Fig. 2.6) sintético, usado como modelo que no tiene valor nutricional como fuente de lisina, puede regenerar este aminoácido aproximadamente en un 50% por hidrólisis con ácido clorhídrico. Es posible que la lisina de las proteínas substituida en el grupo ϵ -amino, regenere este aminoácido durante la hidrólisis protéica, aunque no se aproveche en organismos vivos, lo que resulta en una falsa estimación de la calidad nutritiva de la misma (Carpenter, 1960).

Varios investigadores han intentado evaluar la disponibilidad de lisina por determinación química de grupos de lisina ϵ -amino substituidos o, más frecuentemente lisina no substituida; para ello se han empleado numerosos procedimientos (Carpenter, 1973; Couch y

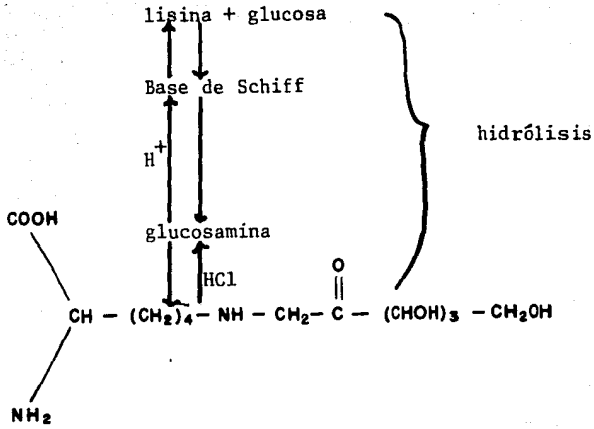


Fig. 2.6. Estructura del ϵ -N-(1-deoxi-D-fructosil)-L-lisina
(Tannenbaum, 1979).

Thomas, 1976) entre los que destacan aquellos que se basan en la reacción del grupo ϵ -amino libre en la proteína con un reactivo cromóforo; la proteína así tratada es posteriormente hidrolizada y el derivado de lisina se cuantifica espectrofotométricamente. El reactivo usado en el procedimiento clásico de Carpenter (1960) es fluorodinitrobenceno (FDNB); el procedimiento de Kakade y Liener (1969) utiliza ácido trinitrobencensulfónico (TNBS), que produce valores similares a los encontrados con el método de Carpenter. En el procedimiento clásico la solución del derivado ϵ -amino hidrolizado se extrae con solventes orgánicos para eliminar el exceso de reactivo y subproductos coloridos de la reacción. Se requiere además de un blanco para corregir una extracción incompleta, y un blanco adicional que contiene la muestra sin el reactivo para corregir la generación de productos coloridos durante la hidrólisis de la proteína. El principal problema técnico se presenta al tratar de minimizar la pérdida del derivado de lisina (ϵ - dinitrofenil lisina (DNP-lisina)) Fig. 2.7 durante la hidrólisis ácida de la proteína, pues es susceptible a reducción de los grupos nitro. Otro problema es la separación y medición del DNP-lisina con un grado de precisión adecuado para utilizarse en cualquier laboratorio, sin embargo, los procedimientos cromatográficos son probablemente los más específicos para esta separación. Se tienen además varias interferencias, principalmente de carbohidratos, y degradación parcial de DNP-lisina que se libera de la hidrólisis con ácido clorhídrico. Este método sin

embargo, no es útil en la cuantificación de grupos ϵ -amino libres estericamente inaccesibles a FDNB, como la lisina que se encuentra como N-terminal de la cadena peptídica o como aminoácido libre.

Carpenter y Ellinger (1956), utilizando 15 muestras de proteínas animales, encontraron una alta correlación entre los resultados de lisina reactiva y el ensayo biológico de las mismas con pollos, ratas y en ensayos in vitro con pepsina.

Como se puede observar, los métodos clásicos usados para cuantificar lisina en proteínas de alimentos tratados térmicamente, son muy complicados y laboriosos, por lo que se han propuesto actualmente métodos alternos que indiquen similarmente el daño que sufre este aminoácido esencial para correlacionarlo con la calidad nutricional de la proteína. Entre los métodos más modernos de medición de lisina reactiva se encuentra el que hace uso de un electrodo "enzimático" selectivo para L-lisina (Skogberg y Richardson, 1979). Más recientemente se ha informado sobre un método utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para cuantificar lisina reactiva (Tomarelli et al., 1985) que fue desarrollado para alimentos con un alto contenido de carbohidratos. Sin embargo, ambos métodos presentan la desventaja de utilizar aparatos que no se encuentran corrientemente en un laboratorio, además de requerir un entrenamiento previo.

Un procedimiento sencillo y rápido desarrollado por Kurrel et al., (1979), es el llamado "dye binding lysine" (DBL) que literal-

mente significa "colorante enlazado a lisina". Se ha utilizado también para cuantificar lisina reactiva en alimentos.

En 1982 Tovar y Carpenter hicieron uso de este método para cuantificar la lisina reactiva en Amaranthus hypochondriacus sometido a un proceso de reventado y fue el método que se empleó en el desarrollo del presente trabajo.

Los métodos de "enlace a colorante" son rápidos y baratos, pueden aplicarse en el control de procesos térmicos en los que se sospeche daño a las proteínas, en cuanto a lisina se refiere. Por lo tanto, estos colorantes presentan perspectivas para emplearse como rutina de análisis y monitoreo, indicativo del daño a lisina que reduce la "capacidad enlazante del colorante". No obstante, cabe hacer mención de que el método no funciona en las primeras fases de la reacción de Maillard, como se explicará más adelante (Lea y Hannan, 1950; Hurrell y Carpenter, 1975).

Los métodos de "enlace a colorante" (DBC), emplean azo compuestos como: "ácido naranja 10", "ácido naranja 12" (A012), ácido 1-fenilazo-2-naftol-6-sulfónico, entre otros. Estos ácido-azo-compuestos se combinan a pH muy bajos con los grupos básicos de lisina, histidina y arginina y con los grupos amino terminales de las cadenas peptídicas y resulta ser un método rápido y muy reproducible (Fraenkel-Conrat y Cooper, 1944; Mossberg, 1968; Lakin, 1973). La cantidad de colorante ligado depende del nivel de proteína en la muestra y hasta el momento, el principal uso para los métodos DBC ha sido para la

evaluación de proteína cruda (Chatterjee y Abrol, 1977).

Se escogió el colorante A012 (Fig. 2.8) para evaluar el daño térmico provocado a proteínas en cuanto a lisina reactiva se refiere.

El método de "enlace del colorante a lisina" (DBL) requiere dos mediciones de "capacidad de enlace a colorante" (DBC) en la proteína (la DBC de un material de prueba es la cantidad de colorante ligado por unidad de peso, bajo ciertas condiciones particulares). En la primera medición "A", el A012 se enlaza a pH ácido con los grupos amino básicos de la proteína "histidina-arginina-lisina" en una relación molar 1:1. El complejo proteína-colorante precipita, sin embargo; con aminoácidos libres no forma complejos insolubles, además la fisión de la cadena peptídica conduce a un incremento de los grupos NH_2 terminales, que también se ligan al colorante. Al menos en teoría, si no existe ruptura de la cadena polipéptidica, el grupo amino N-terminal generalmente se considera despreciable en relación a los grupos amino básicos (Fig. 2.9).

En la segunda medición "B", la proteína se trata con anhídrido propiónico para neutralizar la basicidad de los grupos $\epsilon\text{-NH}_2$ libres de lisina en la proteína por propionilación, con lo que se evalúa "histidina-arginina" (Fig. 2.10). La diferencia entre las evaluaciones "A-B" se considera como "lisina reactiva".

En resumen: cuando una solución de ácido naranja 12 se mezcla con un material proteico, el colorante se une electrovalentemente a los grupos amino básicos de la proteína en solución o no, que prec

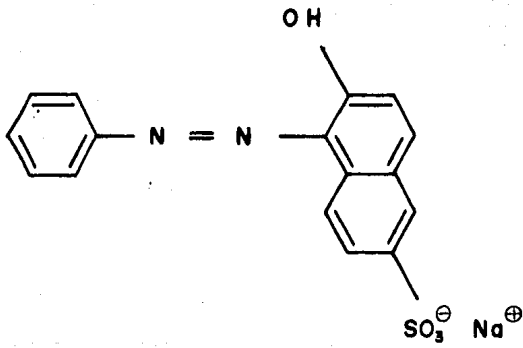


Fig. 2.6. Estructura química del ácido naranja 12 A012.

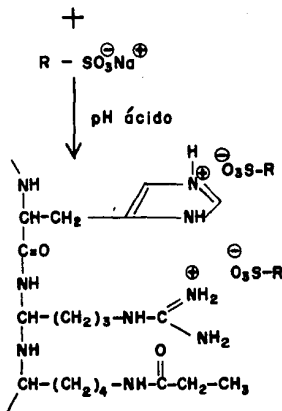
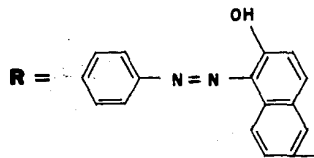
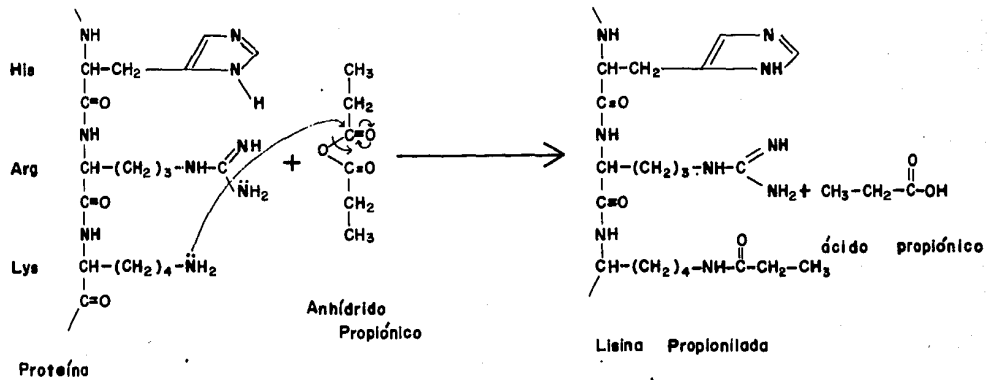


Fig.2.10 Reacciones que se llevan a cabo en la medición de "B" de "colorante ligado a lisina" (DBL).

pita como complejo proteína-colorante. Después del mezclado, en el punto en el que la reacción ha alcanzado el equilibrio, la cantidad de colorante "ligado" se calcula midiendo la extinción del colorante sobrante en la solución. El procedimiento para lisina requiere dos mediciones "A" y "B" y para conocer el valor de lisina-reactiva, al valor "A" se resta el valor "B".

Limitaciones del Método DBL.

En condiciones severas de calentamiento, se da lugar a un entre cruzamiento entre las cadenas polipeptídicas, por una condensación de los grupos ϵ -amino de lisina y los grupos amidas de glutamina y asparagina Fig. 2.4 (Bjarnason y Carpenter, 1970), lo que trae como consecuencia que el colorante no se "ligue" con los grupos que se han condensado con los enlaces amida, además, parece ser que ésto da lugar a una propionilación incompleta, lo que da como resultado un valor más bajo de DBL. Lo que repercute también en una reducción en la digestibilidad de la proteína.

En los alimentos en los que el oscurecimiento no enzimático aparece en condiciones suaves; e.g., glucosa-albúmina almacenada por 10 y 30 días a 37°C la cantidad de colorante (A012) ligado en "A" no mostró cambio, sin embargo, el contenido de lisina reactiva disminuyó en un 37 y 20% respectivamente del valor de las muestras sin tratamiento, con la subsecuente caída en el valor nutricional evaluada en ratas y pollos. Con este tipo de daño, en el que el compuesto predominante es la fructosillisina, que corresponde a los primeros productos de

la reacción de Maillard, Fig. 2.11 (Finot y Mauron, 1972) es probable que estos grupos básicos aún reaccionen con el colorante. Esto sucede porque aún los grupos ϵ -amino de lisina se encuentran carga dos. Sin embargo, la substitución de este grupo impide la reacción con anhídrido propiónico, que permanecerá cargado positivamente y con tribuirá a incrementar la medición "B", incrementando aparentemente las unidades de arginina e histidina, lo que trae como consecuencia una disminución en lisina reactiva. Lo anterior significa que el DBL no es sensible en la detección de las primeras reacciones del oscurecimiento no enzimático, ya que el derivado deoxifructosil-lisina no es aprovechado in vivo y por lo tanto, emite un valor erróneo de la calidad proteica. Cuando el valor de la medición "A" cae significativamente y el valor de lisina también cae dramáticamente, esto se puede explicar porque las reacciones de Maillard pueden parcialmente degradarse hasta sus últimos pasos, produciendo aldehídos de las reductonas que pueden reaccionar con lisina, haciendo menos básico al grupo ϵ -amino. La reacción entre el formaldehído y la proteína elimina la basicidad de los grupos de la lisina. Hurrell y Carpenter (1978) observaron que esto resultaba en una caída drástica en el valor "A" (Fig. 2.12), esta reacción además, procede más al derivado dihidroximetilado que a la base de Schiff, siendo el derivado dihidroximetilado aún una fuente de lisi na que no cuantifica el método.

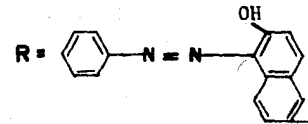
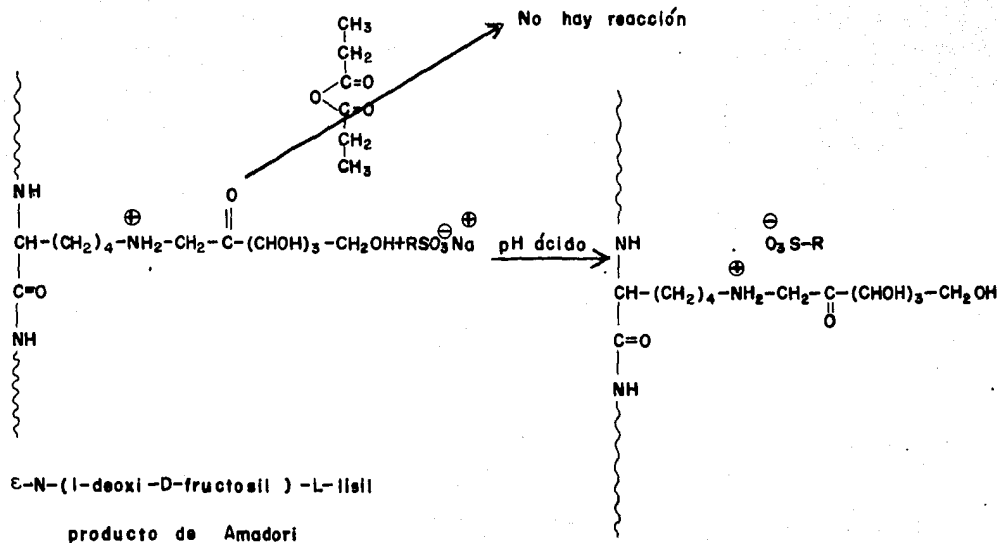


Fig. 2.11 Reacción de AOI2 con los primeros productos de Maillard.

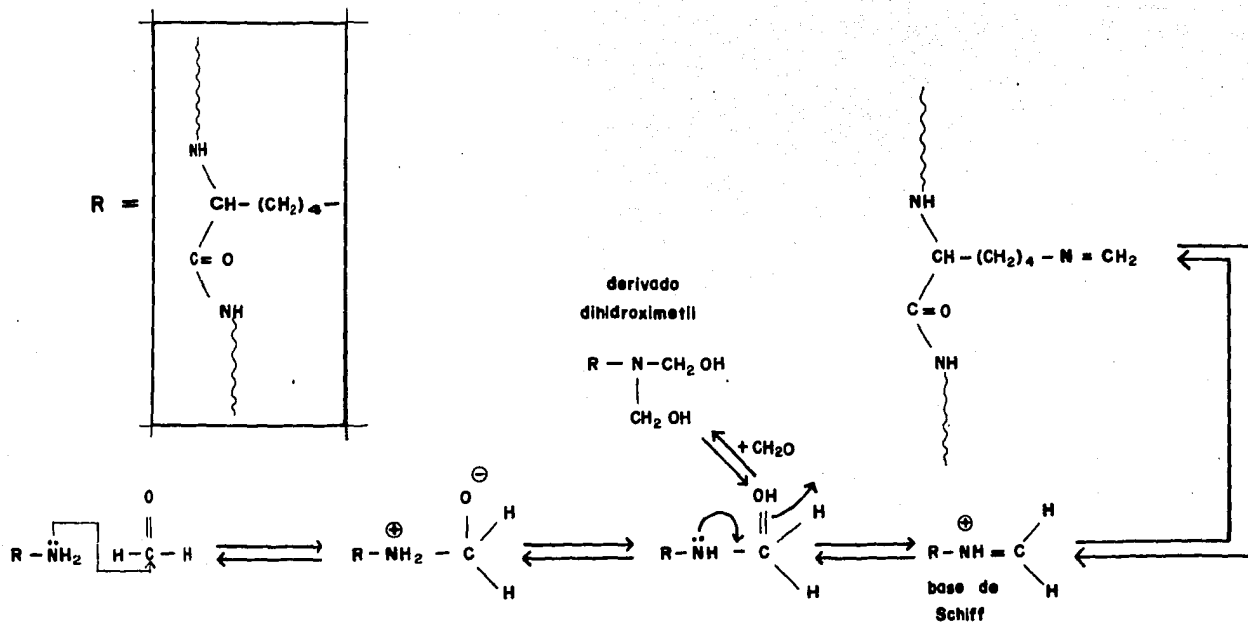


Fig. 2.12 Reacción de lisina con formaldehído. Eliminación de basicidad de E-amino (Tannenbaum, 1979).

Un problema común con el método DBL y el método directo de FDNB para lisina-reactiva, es que en ambos casos se incluye la medición de hidroxillisina al mismo tiempo que la lisina. Este aminoácido no puede reemplazar a la lisina y puede constituir del 12 al 21% del total de "lisina-hidroxillisina" (Finot y Mauron, 1972).

Los carbohidratos como la glucosa y sacarosa no interfieren en la determinación de DBL. Sin embargo, el almidón ha mostrado una cierta capacidad de "ligar" colorante A012, aunque se ha confirmado que no representa un efecto significativo. Polímeros como celulosa o pectinas tampoco interfieren la reacción. Los minerales por su parte, no interfieren grandemente y los lípidos pueden limitar el acceso del colorante a la proteína, por lo que se recomienda, en caso necesario, una extracción previa de lípidos al análisis de DBL. Se ha informado que la lisina libre no es posible cuantificarla por el DBL, lo que quiere decir que no podrá ser empleada en el análisis de alimentos fortificados. El método DBL cuantifica también el N-terminal alfa amino de la cadena polipeptídica, pero esto es despreciable comparado con el número de unidades de lisina de la proteína. El exceso de colorante también influye en la determinación de DBL, por lo que se recomienda aceptar concentraciones residuales del mismo en un rango de 1,2 a 1,8 mmol/l (Hurrell et al., 1979).

En conclusión se puede decir que el método DBL es útil como indicador del daño provocado a las proteínas, como es el entrecruzamiento proteína-proteína y daño "avanzado" por reacciones de

Maillard, siempre y cuando el material a examinar mantenga casi constante la composición de aminoácidos básicos. Sin embargo, no puede utilizarse como indicador en las primeras fases de la reacción de Maillard, además de que mide erróneamente como "lisina reactiva" aquella lisina que esté presente en la proteína en forma D.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

Características Físicas de la Semilla de "Alegría"

La especie de amaranto utilizado durante este trabajo no se identificó pero, pudieron observarse las siguientes características: las semillas eran de color amarillo claro, de forma lenticular, de aproximadamente 1 mm de diámetro, y de gran uniformidad en cuanto al tamaño. Estas semillas fueron adquiridas y cultivadas en Tulye hualco, Distrito Federal, que pueden corresponder a una mezcla de A. hypochondriacus, A. cruentus y a semillas indistintamente híbridizadas.

Reventado de las Semillas y Eficiencia del ProcesoMétodo de Contacto Directo y Lecho Fluidizado

Diez g de semillas se expusieron sobre una superficie caliente a una temperatura de 175°C durante 1.0 min con agitación constante; entre muestra y muestra hubo remoción total de los granos para evitar que se carbonizaran. Los granos así reventados adquieren un mayor volumen, característica que permite separarlas de aquellas no reventadas, pues el resto se tuesta durante el tratamiento. La separación de la fracción reventada se consiguió al quedar retenidas en un tamiz de malla de 11.7 mm de abertura. La evaluación del porcentaje de semilla reventada se determinó considerando unicamente la semilla tostada bajo el siguiente criterio: al reventarse la semilla, ésta se proyecta hacia afuera del recipiente perdiéndose

algunas de ellas, no obstante, la gran mayoría permanecen en el re cipiente. Por otra parte, las semillas tostadas de cada lote a reventar fue casi constante por lo que resultan ser un mejor indicador del reventado de las semillas. El reventado se calculó en base al peso de las semillas tostadas por diferencia a los 10.0 g iniciales, tomándose en consideración la humedad de las semillas tostadas pues pierden peso por la deshidratación que provoca el tratamiento térmico. En el sistema de lecho fluidizado la evalua ción del porcentaje de reventado se realizó de manera semejante. (Apéndice 1)

Reventado de Maíz Palomero

Por cada 200.0 g de semilla de maíz se agregaron 100 ml de aceite de maíz "Mazola" en un recipiente tapado a fuego mediano y con agitación constante, para evitar la carbonización de las semillas no reventadas.

MÉTODOS QUÍMICOS

Análisis Químico Proximal

El análisis químico se efectuó siguiendo los métodos oficiales del AOAC (1980) que incluyeron:

Determinación de humedad por el método de la estufa (método No. 14004); determinación de cenizas por incineración (método No. 14006); determinación de proteína cruda por Macrokjeldahl (método No. 2.049); determinación de fibra cruda por hidrólisis ácida y alcalina (método No. 7,054); determinación de carbohidratos (por diferencia). Estos análisis se practicaron en los siguientes materiales: caseína

(Droguería Cosmopolita, S.A. México, D.F.); amaranto cocido a temperatura de ebullición del agua por 30 min; amaranto tostado por el método de contacto directo; amaranto reventado por el método de contacto directo; amaranto reventado por lecho fluidizado (el lote completo de semillas de amaranto fue adquirido en Tulyehualco, D.F.); harina de maíz nixtamalizado (Minsa distribuida por CONASUPO); harina de maíz nixtamalizado-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50); palomitas de maíz (Verde Valle, S.A. México, D.F., el maíz fue reventado y molido en el laboratorio del Depto. de Alimentos de la Facultad de Química, UNAM); harina de palomitas de maíz-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50). Para lo cual todos los materiales fueron sometidos a una molienda previa usando un molino (Chuo Boeki Goshi Kaisha Central Comercial Co. Ibaraki, Osaka, Japan) a un tamaño de malla de 0.5 mm.

Cocimiento y Deshidratación de Amaranto

Con el fin de eliminar factores antifisiológicos termolábiles, una porción del amaranto que se utilizó para elaborar la dieta control, fue sometido a un proceso de cocción en agua a ebullición (1 parte de amaranto por 7 de agua) por 30 min a presión atmosférica (580 mmHg). Posteriormente se deshidrató sobre charolas en una estufa con vacío a 60°C, para después molerse a un tamaño de malla de 0.5 mm (Bressani, 1983).

Lisina Reactiva por el Método DBL

Debido a que este método se implantó en el laboratorio del

Departamento de Alimentos, y puesto que puede ser utilizado rutinariamente, a continuación se describe:

- a) Se molió la muestra finamente a un tamaño de malla de 0.5 mm.
- b) Se pesó una cantidad adecuada del material de prueba en dos frascos de polietileno (60 ml) que se denominaron "A" y "B" (ver apéndice 2 para determinar la cantidad adecuada de muestra).

A cada frasco se le introdujeron 3 balines de acero inoxidable de 5 mm de diámetro y 1 ml de 2-propanol, se agitó durante 5 min para humedecer la muestra. Al frasco "A" se añade acetato de sodio $\cdot 3H_2O$ al 5.0% (w/v) y al frasco "B" se añade 4 ml de la misma solución y 0.3 ml de anhídrido propiónico. Se agitó vigorosamente por 15 min (para este paso se adaptó una plancha de agitación de un agitador modelo G-24 (New Brunswick Scientific Co, Inc.) intercambiando sus soportes por cilindros de acero inoxidable que alojaron los frascos de polietileno de 60 ml de capacidad.

Esta fue una adaptación realizada por nosotros con apoyo del personal del laboratorio de Ingeniería Química de esta Facultad.

- c) Se añadió 40 ml de solución colorida de ácido naranja 12 (A012) 3.89 mmol/l en un buffer de fosfatos, ácido oxálico y ácido acético (Hurrell et al., 1979). Se agitó por 60 min hasta que se alcanzó el equilibrio.
- d) Se centrifugó la solución a 5000 RPM durante 10 min en una centrífuga IEC HT (Damon/Tec Division, Equipar, S.A. México, D.F.).

- e) Se determinó la concentración del exceso de colorante por espectrofotometría a 475 nm en un espectrómetro Shimadzu UV-120-02 (Shimadzu Corporation Kyoto, Japan); para ello hubo que efectuar una dilución de 1 ml de colorante en 100 ml de agua.
- f) La lectura de las muestras se determinó utilizando una curva estandar de colorante adecuadamente diluida con concentraciones de 1.3 - 1.7 mmol/l.
- g) Las mediciones obtenidas en mmol de colorante ligado por litro son convertidos a mmol de colorante ligado por 100 g de muestra, tomando en consideración los 40 ml (mencionados en el inciso c) de la solución de colorante A012.

$$\left(\text{mmol de colorante ligado} \times \frac{40 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{\text{peso muestra}} \right)$$

Pueden calcularse también los mmol de colorante en base a 16 g de N, tomando en cuenta el porcentaje de proteína cruda de la muestra

$$\left(\text{mmol de colorante ligado} \times \frac{40 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ g}}{\text{peso de muestra}} \times \frac{100\%}{\% \text{ proteína cruda}} \right)$$

- h) Para obtener la cantidad de lisina presente en la muestra, los mmol de colorante ligado por 16 g de N se multiplican por 0.146 (P.M. de lisina 146.19) y de esta manera el resultado quedará expresado como g lys/16 g de N. Finalmente se substraer el resultado del frasco "B" al valor del frasco "A".

Análisis de Óxido Crómico para Pruebas de Digestibilidad in vivo

El análisis de óxido crómico (Varnish y Carpenter, 1975) de las heces deshidratadas recolectadas en el experimento biológico descrito adelante, se efectuó de la siguiente manera:

- a) Se pesaron 200 mg de las heces, sobre papel filtro de cenizas despreciables y se introdujo en un matraz Kjeldahl de 30 ml.
- b) Se adicionaron 3 perlas de vidrio y 2 ml de HNO_3 conc. (para las dietas se usaron 3 ml de HNO_3 conc.):
- c) Se calentó el matraz a temperatura baja hasta que carbonizó totalmente el material:
- d) Se incrementó entonces el calor hasta la deshidratación total de la muestra y se dejó enfriar:
- e) Se añadieron posteriormente 3 ml de la mezcla digestora (Varnish y Carpenter, 1975) calentando hasta la aparición de un color amarillo. A partir de ese momento se dejó ebullición durante 20 min:
- f) Una vez frío, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 ml y se llevó a volumen con H_2SO_4 1.1 M:
- g) Una vez que sedimentó el material en suspensión, se determinó la D.O. a 440 nm contra agua:
- h) Al mismo tiempo se efectuó un estándar que contenía 15 mg de Cr_2O_3 digeridos con la mezcla digestora y diluidos a 100 ml con H_2SO_4 1.1 M.

El porcentaje de Cr_2O_3 se calculó como sigue:

$$\frac{\text{D.O. del std}}{\text{D.O. de muestra}} \times \frac{15 \text{ mg } \text{Cr}_2\text{O}_3}{100 \text{ ml}} \times \frac{25 \text{ ml}}{\text{mg muestra}} \times 100 = \% \text{Cr}_2\text{O}_3$$

- i) Para calcular la digestibilidad aparente de nitrógeno se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidad aparente de nitrógeno} = 100 - \left(100 \times \frac{\text{N heces}}{\text{Cr heces}} \times \frac{\text{Cr dieta}}{\text{N dieta}} \right)$$

Análisis de Aminoácidos

Se utilizó un analizador de aminoácidos Durrum, modelo D-500 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA). Se hidrolizaron aproximadamente 20 mg de la muestra en 10 ml de HCl 6 N en matraces microkjeldahl de cuello estrecho. Los matraces se evacuaron a una presión de 50 μm Hg. Posteriormente se sellaron con flama gas-oxígeno, para luego mantenerse por 22 h en una estufa a 110°C para hidrolizar la muestra. Una vez fríos, los hidrolizados se filtraron a través de un embudo de vidrio poroso y se evaporaron casi a sequedad a 40°C en un rotovapor. El hidrolizado seco se resuspendió en agua deionizada 3 ó 4 veces, para eliminar el HCl residual.

Este análisis se realizó sólo en el amaranto crudo y amaranto reventado-tostado por contacto directo, pues cuando se realizó el análisis aún no se contaba con el resto de los materiales empleados. Para la harina de nixtamal se empleó el aminograma presentado por Bressani y Srimshaw (1958) y en el caso de palomitas de maíz se supuso una composición de aminoácidos semejante al del nixtamal pues no se encontró información en la literatura.

Finalmente, se disolvió en 10 ml de buffer de citrato 0.2 N de pH 2.2. Aproximadamente 200 μ l de cada uno de los hidrolizados disueltos en el buffer de citrato se pasaron por dos columnas de cromatografía de 0.9 x 56 cm y 0.9 x 10 cm de diámetro y altura respectivamente (Moore et al., 1958). La resina que se usó fue Beckman W-1. La temperatura de las columnas fue de 53°C, los flujos del buffer y ninhidrina fueron de 79 y 35 ml/h respectivamente. Se utilizó una mezcla standard de aminoácidos para calibrar el aparato. La norleucina se utilizó como estandar interno.

Racemización de Aminoácidos

Las muestras fueron evacuadas a 30 μ m de Hg en matraces Kjeldahl conteniendo aproximadamente 100 mg de harina de amaranto reventado y crudo. Se agregó ácido γ -aminobutírico como estandar interno y 10 ml de ácido clorhídrico 6N para la hidrólisis. Las muestras se dejaron 6 h a 100°C en una estufa. Después de la hidrólisis se filtraron las muestras con ultramembrana; se lavó el matraz y se evaporó con rotovapor al vacío. Se agregó agua deionizada y se pasó por una columna de intercambio iónico (resina Dowex: 50W x 4, de abertura de malla 50-100). La columna se activó con ácido clorhídrico 2N seguido de agua deionizada. Las muestras se pasaron a la columna y se eluyeron con hidróxido de amonio 2.5N, que posteriormente se eliminó por evaporación con un rotovapor, después se secó cada muestra y se redisolvió en 1 ml de una mezcla etanol-agua (20-80 v/v), 200 μ l de agua deionizada y una pequeña gota de ácido

clorhídrico 1N. Se tomaron 250 μ l de esa solución y se colocaron en un vial de reacción (Pearce Chemical Co.) y se secó mediante una corriente de nitrógeno. El agua se eliminó adicionando dos veces 0.5 - 0.7 ml de dicloruro de metileno y nuevamente secado en una corriente de nitrógeno. Se adicionaron 250 ml de cloruro de acetileno/ n - propanol (20-80 v/v) y se calentó en una parrilla Pearce a 110°C por 30 min. Se eliminó el exceso del reactivo con una corriente de nitrógeno y se añadieron 200 μ l de cloruro de metileno y 100 μ l de ácido trifluoroacético y se calentó a 110°C por 10 min en una estufa. Se eliminó el exceso del ácido trifluoroacético con nitrógeno. Se adicionaron tres veces 0.5 ml de cloruro de metileno y se evaporó nuevamente con nitrógeno. Se disolvió el residuo con 50 μ l de acetato de etilo para tomar de ahí 5 μ l que fueron inyectados en un cromatógrafo de gases Hitachi 263-30 con integrador D-2000 para su análisis (Tovar, 1981).

PREPARACION DE DIETAS

Las dietas fueron preparadas 5 días antes de iniciar el experimento animal, manteniéndose en refrigeración (5°C) hasta su uso.

La composición general de las dietas, basadas en la dieta purificada para ratas y ratones AIN-76 (AIN, 1977) se muestra en la Tabla 3.1, pero modificadas para que las fuentes proteicas utilizadas fueran amaranto sometido a diferentes procesos térmicos o una mezcla de maíz nixtamalizado-amaranto, lo que constituye de acuerdo al American Institute of Nutrition (AIN) dietas no purificadas de

cereales, pues todos los nutrientes de la dieta fueron aportados en parte por los cereales y mezclas de vitaminas y minerales¹. La única dieta purificada fue la que contenía cascina como fuente de proteína. Se puede notar que la única diferencia entre las dietas radica en el contenido de grasa, ésta fue aportada por los materiales de prueba, ya que se utilizó una mezcla del 50-50% de ambos cereales.

Las Tablas 3.2, 3.3 y 3.4 muestran la composición de las mezclas de vitaminas y minerales (ICN Nutritional Biochemicals, Cleaveland, OH. USA), usadas en la preparación de cada dieta. Adicionalmente se encuentran registrados los requerimientos para ratas de estos nutrientes, así como la contribución de minerales del amaranto a la dieta.

En la Tabla 3.4 se puede apreciar que en base a la composición de minerales de la semilla de amaranto reportados en la literatura, se pueden tener probablemente deficiencias en los requerimientos de la rata en calcio, fósforo y yodo, así como un exceso en magnesio, hierro y zinc. Lo anterior sugiere que cuando se utilizan alimentos naturales para la elaboración de dietas es muy difícil ajustar todas las necesidades nutricionales de la especie en estudio, ya que la composición del alimento es muy variable.

¹ Dieta no purificada o dieta basada en cereales. Este término se emplea en el diseño de formulaciones compuestas predominantemente por materiales animales o vegetales no refinados y pueden adicionarse vitaminas o minerales. Dieta purificada. Se aplica a dietas compuestas principalmente de ingredientes refinados, i.e. proteínas, carbohidratos y grasas, con adición de mezclas de vitaminas y minerales (AIN, 1977).

Tabla 3.1 Composición de las dietas con y sin suplementación¹

Ingrediente	g/100 g dieta		
Proteína	10.00		
Grasa	5.00	5.35 ²	17.80 ³
Fibra ⁴	5.00		
Mezcla de vitaminas ⁵	1.00		
Minerales ⁶	3.50		
Sacarosa ⁷	7.40		
Cloruro de colina ⁸	0.11		

¹Basado en la dieta purificada AIN-76 para ratas (1977). Se agregó almidón de maíz "Maizena" a cada una de las dietas hasta hacer el 100%. Los números centrales representan cantidades comunes a todas las dietas.

²Nivel de grasa para la dieta harina de maíz nixtamalizado-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50).

³Nivel de grasa para harina de palomitas de maíz-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50).

⁴Proporcionado por amaranto y celulosa (Fibra no Nutritiva Tekland Diets, Houston Texas).

⁵AIN-76 Mezcla de vitaminas (NAS, 1978a)

⁶AIN-76 Mezcla de minerales (NAS, 1978a)

⁷Azúcar de caña refinada

⁸Comsolmex, S.A., México, D.F.

Tabla 3.2

Composición y aportación a la dieta de la mezcla de vitaminas AIN-76¹

Ingrediente	g/kg de mezcla vitamínica	Cantidad proporcionada por 1% en dieta mg/kg ó UI/kg	Requerimientos de ratas mg/kg ó UI/kg de peso corporal ¹
Tiamina hidrocloreuro	0.6	6.0	1.25
Riboflavina	0.6	6.0	2.5
Piridoxina hidrocloreuro (Vitamina B ₆)	0.7	7.0	7.0
Acido nicotínico	3.0	30.0	15.0
Pantotenato de calcio	1.6	16.0	8.0
Acido fólico ²	0.2	2.0	-
Biotina ²	0.02	0.2	-
Cianocobalamina	0.001	0.01	0.005
Vitamina A ³	-	4000.0 UI	2000.0 UI
Vitamina D ₃ ⁴	0.0025	1000.0 UI	1000.0 UI
Vitamina E	-	50.0 UI	50.0 UI
Vitamina K	0.005	0.05	0.05
Sacarosa pulverizada hasta hacer 1 kg	1 kg		

¹Basado en las recomendaciones para la rata de la National Academy of Science (1978a)²Debido a la síntesis por la flora intestinal, no existen requerimientos dietéticos en condiciones normales³400,000 UI de vitamina A ó 120,000 equivalentes de retinol⁴5000 UI de actividad vitamínica E

Tabla 3.3 Composición de la mezcla de minerales AIN-76¹

Ingrediente	g/kg de mezcla
Fosfato de calcio dibásico	500.00
Cloruro de sodio	74.00
Citrato de potasio, monohidratado	220.00
Sulfato de potasio	52.00
Oxido de magnesio	24.00
Carbonato de manganeso	3.50
Citrato férrico	6.00
Carbonato de zinc	1.60
Carbonato cúprico	0.30
Iodato de potasio	0.01
Selenuro de sodio, pentahidratado	0.01
Sulfato de cromo y potasio, dodecahidratado	0.55
Sacarosa, finamente pulverizada	118.03
TOTAL	1000.00

¹ Basado en las recomendaciones para la rata de la National Academy of Sciences (1978a), para ser usado al 3.5% en dieta.

Tabla 3.4 Contribución de elementos de la mezcla mineral AIN-76 y amaranto a las distintas dietas

Elemento	Cantidad proporcionada por la mezcla AIN-76 a la dieta ¹ mg/100g dieta	Cantidad proporcionada por la semilla de amaranto ² mg/100g dieta	Requerimientos de rata mg/100g dieta ³	Contribución total a la dieta mg/100g
Calcio	193.0 - 223.0	88.0 - 106.0	500.0	281 - 329
Fósforo	149.0 - 171.0	-	400.0	-
Sodio	38.0 - 44.0	4.24 - 6.33	50.0	42.24 - 50.33
Potasio	134.0 - 154.0	-	180.0	-
Magnesio	18.5 - 21.0	185.0 - 230.0	40.0	204 - 251
Manganeso	1.7 - 2.3	1.2 - 1.8	5.0	2.9 - 4.1
Hierro	1.3 - 1.5	5.8 - 13.7	3.5	7.1 - 15.2
Cobre	0.22 - 0.26	0.4 - 0.5	0.5	0.62 - 0.76
Zinc	1.1 - 1.3	2.3 - 2.5	1.2	3.4 - 3.8
Yodo	0.008 - 0.009	-	0.02	-
Selenio	0.004 - 0.005	-	0.004	-
Cromo	-	-	-	-
Cloruro	58.0 - 67.0	-	50.0	-

¹Se agregó a cada dieta de 1.3 a 1.5 g de mezcla de minerales, dependiendo de la materia prima usada por cada 100 g de dieta.

²El amaranto a la dieta contribuye con 1.9 g de cenizas. En base a la composición de minerales de Teutonico y Knorr (1985).

³Basado en las recomendaciones para la rata de la National Academy of Sciences(1978a)

En el caso de la suplementación amaranto-harina de nixtamal, a pesar de que contribuye con 70 mg de Ca adicionales por cada 100 g de dieta, aún así no se alcanzó cubrir los requerimientos de la rata, que son de 500 mg/100 g de dieta; mientras que quizá pudo haber exceso en otros minerales por la contribución adicional del maíz. Se estimó para el caso del maíz palomero, que la composición de minerales y su contribución a la mezcla con amaranto fue la misma que en el caso de nixtamal, ya que no se encontró en la literatura la composición de nutrientes de este alimento.

La composición de cada una de las dietas experimentales pueda observarse en la Tabla 3.5. A todas las dietas por igual se agregaron: mezcla de vitaminas, 1.0 g; sacarosa, 7.40 g; cloruro de colina, 0.11 g; almidón para completar la dieta a 100 g. Los subíndices 1 y 2 en las literales de la Tabla 3.5 corresponden a las dietas de la primera y segunda fase del experimento. Una parte de cada dieta fue marcada con óxido crómico (Varnish y Carpenter, 1975; Tovar, 1981) en la forma de "pan de cromo" a un nivel de 1.0% en las dietas, con el fin de recolectar heces para evaluar su digestibilidad. Cada dieta se elaboró individualmente, ya que todas ellas variaban en la adición de uno o más componentes. Las semillas de amaranto tratadas térmicamente fueron molidas y se homogeneizaron con los demás ingredientes manualmente. Se procuró el mismo tiempo y orden de homogeneizado para las distintas dietas. Los minerales y vitaminas se adicionaron al final de la homogeneiza-

Tabla 3.5 Composición de dietas experimentales¹

Fuente protéica ó ingrediente	A	B	C ₁	C ₂	D ₁	D ₂	E ₁	E ₂	F ₁	F ₂	G ₁	G ₂	H ₁	H ₂
g componente/100g de dieta														
Caseína	12.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amaranto cocido	-	67.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amaranto tostado (CD)	-	-	64.19	65.10	63.87	63.19	-	-	-	-	-	-	-	-
Amaranto reventado (CD)	-	-	-	-	-	-	66.66	67.20	-	-	-	-	-	-
Amaranto reventado (LF)	-	-	-	-	-	-	-	-	65.87	67.20	-	-	-	-
LF-Harina de nixtamal (50-50)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87.03	85.37	-	-
LF-Harina de palomitas (50-50)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87.87	85.51
L-lisina· HCl	-	-	0.123	-	-	0.082	-	-	0.24	-	-	0.18	-	0.25
L-leucína	-	-	-	-	0.05	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-
Aceite de maíz	5.00	-	0.40	-	0.390	0.19	-	0.12	-	-	-	-	-	-
Celulosa	5.00	1.78	2.17	-	2.13	2.10	-	2.06	-	-	1.72	-	0.47	-
Mezcla de minerales	3.50	1.38	1.33	-	1.30	1.55	-	1.52	-	-	1.39	-	1.78	-

¹ Las dietas D₁ y D₂ además fueron adicionadas de L-treonina 0.05; L-metionina 0.240; L-valina 0.050 y L-isoleucina 0.03. Los números centrales representan cantidades comunes a ambas dietas.

ción. Finalmente en la Tabla 3.6 se describe cada una de las dietas experimentales.

Cálculos para la Preparación de las Dietas

Cuando se observó una disminución en el contenido de lisina después de haber tratado térmicamente el amaranto, esto fue utilizando el método DBL, se pretendió entonces reestablecer el nivel de lisina al que se encontraba antes del tratamiento térmico, en base al criterio que a continuación se describe y para ilustrar este cálculo, se explicará la manera como se formuló la dieta C, que consistió de amaranto tostado por contacto directo y en la cual se vio afectada la lisina después del tratamiento. Para la adición de lisina se considero que:

- a) La dieta C o cualquiera deficiente en lisina, debería contener un nivel de lisina igual al del amaranto cocido, esto es 0.621% en la dieta, cada dieta contenía 10% de proteína cruda.
- b) En base al análisis de DBL para lisina, el amaranto tostado proporcionaba 0.498 g de lys/10 g de proteína; por lo tanto:

$$0.498 \text{ g lys/10 g de prot.} - 0.621 \text{ g de lys/10 g de prot.} = -0.123 \text{ g lys/10 g de prot.},$$
 con esto se detectó un déficit de 0.123 g de lys/10 g de proteína en relación al nivel al que debía encontrarse en la dieta.
- c) Ahora debería conocerse a qué cantidad de proteína correspondían los 123 mg de lys, sabiendo que 100 g de la proteína de amaranto contienen 17.09 g de nitrógeno (P.M. de lys=146.2 mg/mmol).

Tabla 3.6 Dietas experimentales

Dieta	Descripción
A	Control de caseína
B	Control de amaranto cocido 30 min a ebullición a presión atmosférica
C ₁	Amaranto tostado por contacto directo (CD) adicionado de lisina
C ₂	Amaranto tostado por contacto directo carente de lisina
D ₁	Amaranto tostado por contacto directo cubriendo los requerimientos de aminoácidos para rata excepto lisina
D ₂	Igual que la dieta D ₁ . sólo que adicionado de lisina
E ₁	Amaranto reventado por contacto directo adicionado de leucina
E ₂	Amaranto reventado por contacto directo carente de leucina
F ₁	Amaranto reventado por lecho fluidizado (LF) adicionado de lisina
F ₂	Amaranto reventado por lecho fluidizado carente de lisina
G ₁	Harina de nixtamal-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50) carente de lisina
G ₂	Igual que G ₁ pero adicionado de lisina
H ₁	Harina de palomitas de maíz-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50) carente de lisina
H ₂	Igual que H ₁ pero adicionado de lisina

$$123 \text{ mg lys} \times \frac{28 \text{ mg N/mmol de lys}}{146.2 \text{ mg/mmol de lys}} \times \frac{100 \text{ g de prot.}}{17.09 \text{ g de N}} = 138.0 \text{ mg de proteína}$$

- d) 123 mg de lisina extra, representaba un incremento de 138 mg al nivel total de proteína, por lo que se tenía que eliminar proteína en la dieta para mantener el 10% de proteína.
- e) Del análisis químico proximal se sabía que 65.10 g de amaranto tostado contenía 10.0 g de proteína, y para evitar el incremento del 0.138% en el nivel protéico se utilizó una menor cantidad de amaranto. En este caso 64.19 g de amaranto contribuían con 9.86 g de proteína, que al adicionarle los 123 mg de lisina (138 mg de proteína), se mantenía de esta manera el nivel del 10% de proteína. En los casos en los que se deseó evaluar deficiencia de lisina, el material se utilizó tal cual (Tabla 3.5).

En la preparación de las dietas D, amaranto tostado por contacto directo, con adición de aminoácidos (Merck de México, Naucalpan de Juárez, Edo. de México), se pretendió cubrir los requerimientos de aminoácidos esenciales para la rata, adicionándolos si la cantidad de amaranto en la dieta no satisfacía el requerimiento, para detectar la posible deficiencia de lisina en el amaranto tratado (Tabla 3.7). Para ello se tomó en cuenta la cantidad de cada aminoácido que aportaban los 10 g de proteína del amaranto tostado, en base al aminograma obtenido previamente, cuyos resultados se muestran en el siguiente capítulo.

Por otro lado, se tomaron en cuenta los requerimientos de

Tabla 3.7 Aporte de aminoácidos esenciales en las dietas D y requerimientos de éstos por la rata

Aminoácido	Aporte de amaranto	Requerimiento de L-a.a. para rata ¹	Adición de L-a.a. 10% de prot.
	g/10 g proteína	g/10 g proteína	g/100 g dieta
Histidina	0.337	0.250	-
Arginina	0.856	0.500	-
Lisina	0.498	0.580	0.082
Treonina	0.360	0.420	0.06
Metionina	0.260	0.500	0.240
Valina	0.450	0.500	0.050
Isoleucina	0.390	0.420	0.03
Leucina	0.570	0.630	0.06
Fenilalanina + tirosina	1.020	0.670	-
Triptofano	0.189	0.130	-

¹Del NAS (1978b)

Tabla 3.8 Aporte de aminoácidos por la suplementación de harina de nixtamal-amaranto reventado (LF) (50-50)

Aminoácido	Aporte por la suplementación ¹ g a.a./100g de mezcla	FAO/WHO (1973) Niños Adultos g/16gN		Requerimientos de L-a.a. para rata ² g/16gN	Cuenta química ³
Lisina	3.71	5.5	2.4	5.80	67.45
Histidina	4.13	1.4	-	2.50	-
Arginina	10.07	-	-	5.00	-
Treonina	5.98	4.0	1.4	4.20	149.5
Metionina	4.66	2.2	-	5.00	211.8
Valina	7.84	5.0	2.0	5.00	156.8
Isoleucina	6.79	4.0	2.0	4.20	169.8
Leucina	10.96	7.0	2.8	6.30	156.6
Triptofano	1.60	1.0	0.7	1.30	160.0
Total de azufrados	4.80	3.5	2.6	-	-
Fenilalanina + tirosina	10.25	6.0	-	6.70	170.83

¹50 g de amaranto reventado (LF) proporciona 7.59 g de proteína (véase Tabla 4.2)

50 g de harina de nixtamal proporciona 4.59 g de proteína (Bressani y Scrimshaw, 1958)

²Del NAS (1978b)

³Cuenta química calculada en base al patrón recomendado por la FAO para niños

aminoácidos de la rata y la diferencia significó la cantidad de aminoácido a agregar. La mezcla de aminoácido que se incorporó contribuyó con el 0.35% de proteína en la dieta, por cálculos similares al realizado previamente para lisina. A la D₂ se le adicionó lisina tomando en consideración el requerimiento de la rata.

Para la preparación de la dieta G se tomó en cuenta un programa de computación realizado en el Instituto Nacional de Nutrición (Rivas, 1985). Se encontró que la mezcla amaranto-maíz que satisfacía los requerimientos en cuanto a aminoácidos esenciales, es la que aporta 51% amaranto y 49% maíz, que contribuyen en cuanto a la proteína de la mezcla, el 60% y 40% respectivamente. En este trabajo, no obstante, se prefirió trabajar con una mezcla 50-50% de ambos cereales, con un contenido proteínico de 12.18 g por cada 100 g de mezcla, con una contribución protéica del 62.32% por el amaranto y del 37.68% por la harina de nixtamal. Se calculó la cantidad de aminoácidos aportada por este alimento (Tabla 3.8) y se comparó la suplementación con el perfil de aminoácidos de la FAO (1973) para niños y adultos, y también para la rata. Resultó que la suplementación sólo fue deficiente en lisina, tanto para niños como para cubrir los requerimientos de la rata, no así para los adultos cuyo requerimiento es más bajo. Se puede observar que los demás aminoácidos se encuentran en exceso para los tres casos, con lo cual solo fue necesario agregar lisina a la suplementación al

nivel que establece la NAS (1978b) para cubrir los requerimientos de la rata, ya que este fue nuestro modelo experimental (5.8 g lys/100 g de prot.). La cuenta química de la suplementación resultó ser de 67.45, limitante en lisina y calculada en base a los requerimientos de aminoácidos para niños ó 64.0 en base a los requerimientos de la rata. Se puede apreciar que 100 g de la mezcla amaranto reventado (LF)-maíz proporcionaría un exceso de aminoácidos esenciales a excepción de lisina. Todas las dietas fueron isoprotéicas e isocalóricas, a excepción de las dietas con suplementación (G y H) que resultan ser sólo isoprotéicas, ya que como se indicó arriba, el contenido de grasa es mayor que en el resto de las dietas.

EXPERMIENTO BIOLOGICO

Se utilizaron 48 ratas Wistar machos recién destetados, de 23 días de nacidos, con pesos de 32 a 72 g, que habían sido alimentados con "Nutricubos de Purina" (Naucalpan de Juárez, Edo. de Mex.). Al momento mismo de recibir a los animales se efectuó una estratificación por pesos de los animales (la suma de pesos de cada grupo no fue significativamente diferente a $p < 0.05$) en un rack de 48 jaulas de aluminio de 21.5 x 17.5 x 14 cm (8 jaulas verticales por 6 horizontales), que se fijó en la pared para evitar movimientos y ruidos bruscos que perturbaran la tranquilidad del animal.

Se formaron 8 grupos de 6 animales cada uno, que correspondían a 8 dietas experimentales, que fueron distribuidas al azar en el rack, sin permitir que la misma dieta se repitiera inmediatamente después (Fig. 3.2).

ESTRATO 1° 2° 3° 4° 5° 6°

1A 72.0	2C 49.2	3B 46.0	4F 42.4	5H 42.2	6D 32.4
1B 70.0	2E 49.4	3D 46.0	4A 42.4	5C 42.2	6G 34.6
1H 67.0	2G 50.0	3C 46.0	4E 43.0	5D 41.7	6F 34.6
1C 67.0	2D 51.0	3H 45.9	4B 43.0	5E 41.0	6A 35.0
1E 62.0	2F 54.4	3A 45.1	4G 43.0	5B 40.4	6C 37.5
1G 57.9	2H 54.8	3E 45.1	4D 43.6	5F 40.4	6B 38.0
1D 57.6	2A 56.7	3F 45.1	4C 43.9	5G 40.0	6H 38.5
1F 56.9	2B 56.8	3G 44.1	4H 43.9	5A 39.6	6E 38.9

2C 49.2

16: # de jaula

2: # de rata

C: dieta

49.2: peso

Dieta	A	B	C	D	E	F	G	H
Suma de pesos iniciales por grupo:	290.8	294.2	285.6	272.6	279.4	273.7	269.3	292.2

Fig. 3.2 Esquema de estratificación de las ratas por pesos y distribución de dietas al azar. La tabla muestra las sumas de pesos iniciales de las seis ratas por cada dieta.

Los animales fueron alimentados ad libitum y cada tercer día se les proporcionó alimento fresco. Además, tenían acceso de igual manera a beber agua, la cual previamente había sido potabilizada (0.75 ml de hipoclorito de sodio por cada 20 l de agua). Esta agua era cambiada dos veces por semana.

Los animales se identificaron con una clave que incluía número de rata y la literal que identificaba a cada dieta. La temperatura del bioterio no se reguló, pues no fue necesario ya que se trabajó en primavera (del 17 de abril al 12 de mayo de 1986), registrándose como temperatura mínima 20°C y como máxima 26°C. Tampoco fue necesario controlar la luz del cuarto, ya que en esta estación el período de luz y oscuridad es casi el mismo; aproximadamente 12 h. Los pesos de los animales se registraron cada tercer día, antes de que ingirieran alimento fresco. Las dietas de caseína y amaranto cocido fueron los controles del experimentos.

Este experimento se realizó por un período de 26 días en dos etapas. La primera etapa consistió en la administración por 15 días de las dietas que contenían como fuente proteica el amaranto, sometido a diferentes condiciones térmicas, con carencia o adición de los aminoácidos lisina o leucina (Tabla 3.6).

En esta primera fase en el décimo día se marcó cada dieta con óxido crómico, con el fin de recolectar heces para determinar la digestibilidad de las distintas fuentes proteicas. La segunda fase transcurrió durante los 11 días siguientes. En esta fase se adi-

cionaron a las distintas dietas el aminoácido en que ésta era deficiente en la primera etapa, o se hizo deficiente en ese aminoácido a la dieta que ya se le había adicionado durante los primeros 15 días de prueba. Al octavo día de esta segunda etapa, las dietas fueron marcadas con óxido crómico.

Métodos de Evaluación Protéica

La calidad de las proteínas se midió por la relación de eficiencia protéica (PER) de acuerdo al procedimiento de la AOAC (1980); retención neta de proteínas (NPR), en este parámetro se supuso una pérdida teórica de peso de 1.4% al día (Mc Laughlan, 1976); utilización neta de proteínas (NPU), considerando teóricamente una composición del cadáver del animal de 16% de proteína (Mc Laughlan, 1976) y el valor biológico (BV) aplicando la fórmula de Miller y Bender (1955). Tanto el NPU, el BV y la digestibilidad fueron importantes, pues no se consideraron las pérdidas metabólicas para ambas fases.

Prueba de Digestibilidad in vivo

La digestibilidad de las dietas se midió usando óxido crómico como indicador (Schürch et al., 1950; Dansky y Hill, 1952; McRae y Armstrong, 1969; Varnish y Carpenter, 1975) a través de un "pan de cromo" (Tovar, 1981) que se preparó con 30 g de óxido crómico y 70 g de almidón de "Maizena," homogenizando la mezcla perfectamente con 40 ml de agua destilada. La masa resultante se extendió sobre un papel aluminio para secarse dentro de una estufa a 90°C durante toda

cionaron a las distintas dietas el aminoácido en que ésta era deficiente en la primera etapa, o se hizo deficiente en ese aminoácido a la dieta que ya se le había adicionado durante los primeros 15 días de prueba. Al octavo día de esta segunda etapa, las dietas fueron marcadas con óxido crómico.

Métodos de Evaluación Protéica

La calidad de las proteínas se midió por la relación de eficiencia protéica (PER) de acuerdo al procedimiento de la AOAC (1980); retención neta de proteínas (NPR), en este parámetro se supuso una pérdida teórica de peso de 1.4% al día (Mc Laughlan, 1976); utilización neta de proteínas (NPU), considerando teóricamente una composición del cadáver del animal de 16% de proteína (Mc Laughlan, 1976) y el valor biológico (BV) aplicando la fórmula de Miller y Bender (1955). Tanto el NPU, el BV y la digestibilidad fueron aparentes, pues no se consideraron las pérdidas metabólicas para ambas fases.

Prueba de Digestibilidad in vivo

La digestibilidad de las dietas se midió usando óxido crómico como indicador (Schürch et al., 1950; Dansky y Hill, 1952; McRae y Armstrong, 1969; Varnish y Carpenter, 1975) a través de un "pan de cromo" (Tovar, 1981) que se preparó con 30 g de óxido crómico y 70 g de almidón de "Maizena", homogenizando la mezcla perfectamente con 40 ml de agua destilada. La masa resultante se extendió sobre un papel aluminio para secarse dentro de una estufa a 90°C durante toda

la noche. Una vez seco el "pan de cromo", se pulverizó a un tamaño de malla del número 40. Al décimo día de la primera etapa y al octavo día de la segunda, se administraron a las ratas las dietas marcadas con el "pan de cromo" al 1%; 24 h después se recolectaron las heces de color verde, diariamente hasta los días 15 y 11 de las etapas primera y segunda respectivamente. Posteriormente las heces se secaron a una temperatura de 60°C durante toda la noche en una estufa para después ser molidas a un tamaño de malla del número 40.

METODOS ESTADISTICOS

Se utilizaron análisis de varianza y prueba "t de student" para los análisis químico proximales y contenido de lisina-reactiva del amaranto, con el objeto de detectar el efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre el contenido de proteína cruda y lisina-reactiva de cada material.

Para el experimento biológico se utilizaron también análisis de varianza, prueba "t de student" y prueba de Duncan para determinar si existía diferencia significativa en el desarrollo de los animales experimentales, debido al deterioro de la proteína del amaranto sometido a los distintos tratamientos térmicos. Todas las pruebas se manejaron a un nivel de significancia $p < 0.05$ (Bender et al., 1982).

CAPITULO IV

RESULTADOS

Eficiencia del Reventado

En la Tabla 4.1 se registra la eficiencia del reventado de los diferentes métodos empleados en este trabajo. No se encontró diferencia significativa entre el rendimiento de los diferentes métodos que se emplearon para el reventado de la semilla ($p < 0.05$). Cabe hacer mención que si el reventado se efectúa en un laboratorio o en forma tradicional la eficiencia es similar. La diferencia radica en la experiencia de la persona que revienta la semilla en grandes volúmenes, pero con cantidades menores (10 g) este factor no influye. Se constató con productores de "alegrías" en Tulyehualco, D.F. que tanto la semilla tostada como reventada se utilizan en la manufactura de la "alegría", pero es más cara la que emplea exclusivamente semilla reventada. Las "alegrías" elaboradas con semilla tostada son de precio inferior, el dulce es de mayor tamaño y van acompañadas de las basuras contaminantes de la materia prima.

Análisis Químico de las Materias Primas

El análisis químico proximal de las semillas de amaranto sometidas a los diferentes tratamientos térmicos se puede apreciar en la Tabla 4.2. En la misma tabla se muestra el análisis de un dulce de "alegría" elaborado con semilla tostada. No se encontró diferencia significativa en el contenido de los diferentes macronutrientes del amaranto sometido a diferentes procesos térmicos ($p < 0.05$) y los resultados

Tabla 4.1 Eficiencia del reventado de la semilla de amaranto por diferentes métodos.

Método	% Semilla reventada	
<u>Contacto directo</u>		
Tradicional ¹	66.0 ± 5.0	(10) ²
Laboratorio	64.8 ± 5.2	(10)
Lecho fluidizado	61.5 ± 9.9	(3)

¹Reventado en Tulyehualco, D.F.

²El número entre paréntesis indica el número de réplicas

Tabla 4.2

Análisis químico proximal del amaranto sometido a diferentes tratamientos¹

Componente	Caseína	Amaranto crudo	Amaranto cocido	Amaranto reventado (CD)	Amaranto tostado (CD)	Amaranto reventado (LF)	Dulce de "alegría"
		g/100g					
Humedad	8.91 ± 0.01	10.80 ± 0.03	5.91 ± 0.08	3.46 ± 0.05	4.44 ± 0.03	2.0 ± 0.00	6.30 ± 0.02
Proteína ²	77.24 ± 0.01	14.18 ± 0.00	14.89 ± 0.06	14.88 ± 0.05	5.36 ± 0.04	14.88 ± 0.00	9.77 ± 0.13
Extracto etéreo		6.77 ± 0.22	7.46 ± 0.22	7.15 ± 0.36	7.06 ± 0.00	7.26 ± 0.05	4.90 ± 0.03
Fibra cruda		4.46 ± 0.00	4.91 ± 0.00	4.32 ± 0.00	4.34 ± 0.00	4.38 ± 0.04	2.98 ± 0.04
Cenizas		2.86 ± 0.00	3.15 ± 0.00	2.90 ± 0.00	3.34 ± 0.01	2.94 ± 0.01	2.18 ± 0.00
Extracto libre de N ³		60.93	63.68	67.29	65.46	68.54	73.87

¹ Se da el promedio de tres réplicas y su desviación estandar² % N x 5.85³ por diferencia

Tabla 4.3 Análisis químico proximal de harina de nixtamal, palomitas de maíz y su suplementación con amaranto reventado por lecho fluidizado¹

Componente	Harina de nixtamal (HN)	Palomitas de maíz (PM)	HN-amaranto reventado (LF) 50-50	PM-amaranto reventado (LF) 50-50
	g/100 g			
Humedad	9.06 ± 0.02	2.45 ± 0.11	5.67 ± 0.02	2.24 ± 0.01
Proteína ²	8.35 ± 0.13	8.63 ± 0.02	11.49 ± 0.17	11.38 ± 0.06
Extracto etéreo	5.13 ± 0.01	34.89 ± 0.01	6.15 ± 0.00	20.22 ± 0.07
Fibra cruda	2.80 ± 0.02	6.33 ± 0.03	3.56 ± 0.07	5.16 ± 0.03
Cenizas	1.94 ± 0.00	1.10 ± 0.00	2.42 ± 0.05	1.96 ± 0.01
Extracto libre de N ³	72.72	49.05	70.71	59.04

¹ Se da el promedio de tres réplicas y su desviación estándar

² % N x 6.25

³ por diferencia

del análisis químico proximal concuerdan con los que han aparecido en la literatura (Sánchez-Marroquín, 1983; NRC, 1984; Becker et al., 1981). El dulce de "alegría" resultó ser inferior en todos los nutrientes en comparación del amaranto procesado, con un aumento considerable de carbohidratos, lo cual era de esperarse puesto que en el dulce las semillas se encuentran atrapadas en una miel de piloncillo o de abeja. En la Tabla 4.3 están registrados los análisis de las mezclas maíz-amaranto, así como la composición individual de cada componente. Las mezclas resultaron ser de composición proteica semejante, pero diferente en los demás nutrientes.

Lisina-Reactiva (DBL)

La Tabla 4.4 presenta los resultados para la curva estándar, ecuación y coeficiente de correlación que se utilizó para la cuantificación de lisina-reactiva de los distintos materiales de prueba que se encuentran registrados en la Tabla 4.5. Se encontró un contenido de lisina similar al encontrado por diferentes autores, medida por análisis de aminoácidos, tanto para la semilla cruda como cocida (Tovar y Carpenter, 1982; Sánchez-Marroquín, 1983; NRC, 1984). El método DBL, indicó que el contenido de lisina-reactiva para el amaranto reventado por contacto directo no se vio afectado. Sin embargo, se registró por el mismo método, una disminución significativa del 20% ($p < 0.05$) en el contenido del aminoácido para el amaranto tostado por contacto directo, respecto a la semilla cruda o cocida, pero la disminución más dramática se observó con el ama-

Tabla 4.4 Curva estándar usada para lisina-reactiva (DBL)¹

A012	Absorbancia	Ec. y coeficiente de correlación
mmol/l	475 nm	
1.3	0.231	$y = 0.16x + 0.0208$
1.4	0.240	
1.5	0.263	$r = 0.9933$
1.6	0.278	
1.7	0.292	

¹Se dan los resultados promedios de 3 réplicas

Tabla 4.5 Contenido de lisina-reactiva (DBL) de los distintos materiales empleados.¹

Alimento	g lys/100 g proteína
<u>Amaranto</u>	
crudo	6.21 ± 0.02
cocido	6.21 ± 0.25
tostado (CD)	4.98 ± 0.18
reventado (CD)	6.89 ± 0.05
reventado (LF)	3.84 ± 0.07
Dulce de "alegría"	2.74 ± 0.25
Harina de nixtamal (HN)	3.46 ± 0.22
Palomitas de maíz (PM)	1.34 ± 0.21
<u>Mezclas</u>	
HN-amaranto reventado (LF) (50-50)	3.71 ± 0.20
PM-amaranto reventado (LF) (50-50)	2.95 ± 0.18

¹Se dan los resultados promedio de 3 réplicas con su desviación estándar

ranto reventado por lecho fluidizado, que fue del 38%, que concuerda con los valores encontrados del 24 al 37% por autores como Martine de Lespinasse en 1979 y Tovar y Carpenter en 1982. En base a una prueba "t de student" se encontró que entre estos dos últimos existe diferencia significativa ($p < 0.05$), lo que indica que el amaranto tratado con aire caliente resulta más dañado que por contacto directo, a juzgar por estos resultados.

En cuanto a las mezclas, a pesar de que éstas están suplementadas en una proporción idónea, desde el punto de vista de composición de aminoácidos, amaranto-maíz (50-50), tienen un contenido de lisina-reactiva muy bajo, pues teóricamente debería de ser entre 4.8 a 5.7 g/100 g de proteína. Esto es porque se empleó para ello amaranto reventado por lecho fluidizado. En efecto, lo que se pretendió fue elaborar estas mezclas para corroborar si realmente se dañó el aminoácido por el tratamiento térmico o si se trataba de una limitación del método analítico y para este fin serviría posteriormente el método biológico, de no ser así, se esperaba que resultara una buena fuente de proteína para las ratas a las que se les administró la dieta. De cualquier manera, la dieta fue enriquecida en una segunda etapa del experimento biológico, con lisina HCl, hasta el nivel recomendado por la NAS (1978) para la rata.

La cuenta química para la mezcla de harina de nixtamal-amaranto, en relación a los requerimientos de aminoácidos de la rata, resultó

ser de 64 (Tabla 3.8) y limitante en lisina. No se pudo comprobar con el método DBL el enriquecimiento con lisina, ya que este último no forma con el colorante un complejo insoluble que permita cuantificarle y debe suponerse entonces que la cuenta química es supuestamente 100% después del enriquecimiento de esta dieta con lisina.

Análisis de Aminoácidos y Racemización

Los aminogramas del amaranto crudo y amaranto reventado-tostado, así como la cuenta química se pueden apreciar en la Tabla 4.6. En el caso del amaranto reventado-tostado se encontró una deficiencia en lisina con una cuenta química de 56.18, pero en leucina permanece alto. Para el amaranto reventado-tostado (CD) se encontraron cuatro picos que no lograron ser identificados. Es conveniente resaltar que tanto el analizador de aminoácidos como el método DBL, registraron valores muy bajos para lisina en el amaranto reventado-tostado por contacto directo (Tabla 4.5).

Racemización de Aminoácidos

El porcentaje de racemización del amaranto crudo y reventado-tostado (CD) está registrado en la Tabla 4.7. La racemización de aminoácidos del amaranto crudo se debe al tratamiento al que es sometida la proteína previo al análisis. Los aminoácidos que no se afectan por este tratamiento son treonina, isoleucina, serina, asparagina y metionina en el amaranto crudo. Para el amaranto reventado-tostado se observó que no hubo racemización en treonina,

Tabla 4.6 Perfil de aminoácidos de la semilla de amaranto

Aminoácido	crudo		reventado-tostado (CD)	
	g/100 g de proteína	cuenta química	g/100 g de proteína	cuenta química
Acido aspártico	11.08		10.50	
Treonina	4.58	114.50	4.39	109.75
Serina	8.38		7.08	
Acido glutámico	22.11		22.40	
Prolina	5.61		5.46	
Glicina	10.51		10.22	
Alanina	4.92		5.23	
Cistina	1.47		-----	
Valina	5.56	111.20	5.58	111.60
Metionina	2.79	126.82	3.33	151.36
Isoleucina	4.85	121.25	5.03	125.75
Leucina	7.48	106.86	7.73	110.43
Tirosina	4.71		4.72	
Fenilalanina	5.45	194.64	5.53	197.50
Histidina	3.67		3.37	
Lisina	7.54	137.09	3.09	56.18
Arginina	13.05		9.31	
X ₁			0.11 ¹	
X ₂			0.36 ²	
X ₃			0.34 ³	
X ₄			0.18 ⁴	

^{1,2,3 y 4} Se calcularon como leucina

Cuenta química = $\frac{\text{contenido de a.a. esenciales en la muestra (g/100g de prot.)}}{\text{contenido de a.a. esenciales en el patrón FAO(1973) g/100g prot.}} \times 100$

Tabla 4.7 Racemización de aminoácidos en amaranto crudo y reventado¹

Aminoácido	Amaranto crudo	Amaranto reventado (CD)
Alanina	2.5	3.2
Valina	0.8	0.4
Treonina	0	0
Isoleucina	0	0
Serina	0	0
Leucina	1.7	1.2
Prolina	n.d. ²	n.d.
Cistina	n.d.	n.d.
Asparagina	traza	23.9
Metionina	0	6.4
Fenilalanina	1.6	2.0
Glutamina	2.4	5.5
Tirosina	n.d.	n.d.
Lisina	n.d.	n.d.

¹Grado de racemización ($\frac{D}{D+L} \times 100\%$) se da el promedio de 3 corridas

²n.d. no se determinó

isoleucina y serina pero sí para el resto de los aminoácidos, siendo los aminoácidos más afectados después del tratamiento térmico, la alanina (3.2%), la asparagina (23.9%), la metionina (6.4%) y la glutamina (5.5%). La prolina tanto para el amaranto crudo como tratado térmicamente, mostró picos del aminograma tan pequeños que no permitieron calcular la racemización del aminoácido. En la cistina no se observó pico alguno en ambos casos y aunque se registró racemización de tirosina y lisina, para el amaranto crudo y para el reventado-tostado, las fluctuaciones entre las determinaciones fueron tan grandes que no permitieron hacer un cálculo de racemización para estos aminoácidos.

Evaluación Biológica

En la Tabla 4.8 se presentan los niveles de lisina de cada una de las dietas. Las dietas A y B fueron los controles de caseína y amaranto para todo el experimento respectivamente, a las cuales no se les varió el nivel de lisina y los valores registrados fueron los niveles de lisina que aportaron los materiales per se, la fase en que se adicionó o se hizo carente a la dieta en lisina se encuentra registrada al pie de la misma Tabla.

En base a la cuantificación de lisina-reactiva por el método DBL el nivel de este aminoácido no fue modificado en las dietas E₁ y E₂, pues no se detectó una disminución de este nutriente debido al reventado de la semilla. Las dietas D₂, G₂ y H₂ se llevaron al nivel de lisina requerido por la rata (NAS, 1978). La dieta E₁ fue

Tabla 4.8 Niveles de lisina en las dietas de prueba

Dieta	% Lys en dieta	Dieta	% Lys en dieta
A	0.75	A	0.75
B	0.62	B	0.62
C ₁	0.62	C ₂	0.50
D ₁	0.50	D ₂	0.58 ¹
E ₁	0.68	E ₂	0.68
F ₁	0.62	F ₂	0.38
G ₁	0.37	G ₂	0.58 ¹
H ₁	0.30	H ₂	0.58 ¹

¹Nivel de lisina recomendado por la NAS (1978b)

- A Control de caseína
- B Control de amaranto cocido 30 min a ebullición a presión atmosférica
- C₁ Amaranto tostado por contacto directo (CD) adicionado de lisina
- C₂ Amaranto tostado por contacto directo carente de lisina
- D₁ Amaranto tostado por contacto directo cubriendo los requerimientos de aminoácidos para rata excepto lisina
- D₂ Igual que la dieta D₁, adicionado de lisina
- E₁ Amaranto reventado por contacto directo adicionado de leucina
- E₂ Amaranto reventado por contacto directo carente de leucina
- F₁ Amaranto reventado por lecho fluidizado (LF) adicionado de lisina
- F₂ Amaranto reventado por lecho fluidizado (LF) carente de lisina
- G₁ Harina de nixtamal-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50) carente de lisina
- G₂ Igual que la dieta G₁, pero adicionado de lisina
- H₁ Harina de palomitas de maíz-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50) carente de lisina
- H₂ Igual que H₁ pero adicionado de lisina

adicionada de leucina en la primera fase al nivel recomendado por la NAS (1978) para la rata, que es de 6.3 g/100 g de proteína, como óptimo para su desarrollo.

En la Tabla 4.9 se encuentran registrados los pesos ganados, alimento consumido y la eficiencia alimentaria de los animales alimentados con las distintas dietas, para las diferentes fases experimentales.

En la primera fase de 15 días de prueba, las ratas alimentadas con la dieta B registraron el mayor consumo de alimento (11.16 g/rata/día), superando a la dieta control de caseína A (9.57 g/rata/día), y a las dietas C₁, D₁, F₁ y G₁ que no varían significativamente en su consumo. Mientras que las dietas E₁ y H₁ registraron el menor consumo (8.09 y 7.44 g/rata/día respectivamente). En la segunda fase (11 días) de igual forma se registró el mayor consumo para la dieta B y de manera sorprendente la dieta D₂ fue consumida de manera similar al control A (12.10 y 11.10 g/rata/día respectivamente), las dietas C₂, E₂ y F₂ no registraron un cambio significativo y la dieta H₂ registró nuevamente el menor consumo de alimento. En la misma Tabla (4.9) se puede observar que en la primera fase la ganancia en peso sigue el mismo comportamiento que para el consumo de alimento; las dietas B y A con ganancias de 3.69 y 3.28 g/rata/día respectivamente, C₁, D₁, E₁, F₁ y G₁ no presentan una diferencia significativa en el aumento de peso, y nuevamente H₁ registró la menor ganancia en peso.

Tabla 4.9

Resultados del experimento animal durante la primera y segunda fases¹

Alimento consumido		Peso ganado		Eficiencia alimentaria ²							
g/rata/día											
A	9.57±1.67	A	11.10±1.18	A	3.28±0.44	A	3.19±0.29	A	0.346±0.04	A	0.289±0.03
B	11.16±2.08	B	15.10±2.95	B	3.69±0.68	B	4.18±1.12	B	0.331±0.03	B	0.273±0.04
C ₁	8.47±1.07	C ₂	10.48±0.93	C ₁	2.07±0.35	C ₂	2.82±0.72	C ₁	0.244±0.03	C ₂	0.268±0.06
D ₁	8.91±1.31	D ₂	12.10±1.57	D ₁	2.26±0.44	D ₂	3.84±0.67	D ₁	0.253±0.03	D ₂	0.316±0.02
E ₁	8.09±1.11	E ₂	10.36±2.67	E ₁	2.06±0.45	E ₂	2.81±0.87	E ₁	0.253±0.03	E ₂	0.268±0.04
F ₁	8.40±1.76	F ₂	10.23±1.74	F ₁	2.22±0.57	F ₂	2.83±0.88	F ₁	0.270±0.03	F ₂	0.276±0.07
G ₁	8.97±2.60	G ₂	10.30±2.66(3)	G ₁	2.27±0.91	G ₂	2.70±0.66(3)	G ₁	0.246±0.03	G ₂	0.263±0.01(3)
H ₁	7.44±1.88(5)	H ₂	8.11±1.69(5)	H ₁	1.50±0.60(5)	H ₂	1.75±0.37(5)	H ₁	0.198±0.03(5)	H ₂	0.217±0.03(5)

¹Todos los resultados son el promedio de seis réplicas, excepto los indicados en los paréntesis, cada literal denota la dieta experimentada (Ver Tabla 4.8).

²Eficiencia alimentaria = peso ganado/ alimento consumido.

Durante la segunda fase se observó un comportamiento similar al consumo de alimento con respecto al observado en la primera fase. B se mantuvo registrando el mayor aumento de peso (4.18 g/rata/día), seguido del control A, que permaneció constante respecto a la etapa anterior (3.19 g/rata/día) y D₂ registró un aumento significativo en el peso, de igual manera como sucedió con el consumo de alimento (3.84 g/rata/día), equiparándose al grupo alimentado con caseína. También se detectó un aumento de peso en E₂, semejante a C₂, F₂ y G₂, quedando nuevamente en último término H₂ (1.75 g/rata/día). Únicamente en el caso de la dieta D₁ se detectó una diferencia significativa entre el peso ganado por los animales, en relación al peso ganado durante la segunda fase (dieta D₂), debido a la adición de lisina a $p < 0.05$, en el que hubo un mayor aumento de peso que en el resto de los animales alimentados con las otras dietas.

Finalmente, en la Tabla 4.10 se encuentran registrados los pesos promedio alcanzados en cada una de las fases experimentales del experimento biológico.

Una herramienta útil que muestra la calidad de la dieta es la eficiencia alimentaria, que relaciona la ganancia en peso de los animales durante el período de experimentación, con respecto al consumo de la dieta (Pellet y Young, 1980) (Tabla 4.9).

Cuando la dieta posee un nivel protéico del 10.0%, la eficiencia alimentaria presenta el mismo comportamiento que la relación de eficiencia protéica (PER) (Osborne et al., 1919). En la Tabla

Tabla 4.10 Pesos medios alcanzados al finalizar cada una de las fases experimentales del ensayo biológico¹

Dieta	Peso inicial día cero	Pesos finales			
		Dieta		Dieta	
	g		g		g
A	48.47 ± 13.86	A	97.63 ± 16.74	A	132.80 ± 15.81
B	49.03 ± 11.96	B	104.12 ± 22.13	B	150.10 ± 33.97
C	47.63 ± 11.05	C ₁	78.98 ± 12.36	C ₂	109.60 ± 11.20
D	45.43 ± 9.33	D ₁	79.32 ± 11.95	D ₂	121.57 ± 14.76
E	46.57 ± 8.65	E ₁	71.50 ± 14.57	E ₂	102.30 ± 21.16
F	45.62 ± 8.31	F ₁	78.90 ± 16.14	F ₂	110.01 ± 15.06
G	44.88 ± 8.61	G ₁	75.23 ± 19.82	G ₂	97.96 ± 30.69
H	48.70 ± 10.67	H ₁	73.32 ± 16.59 (5)	H ₂	77.15 ± 21.05

¹Se da el promedio de seis ratas (ver Tabla 4.8)

4.11 se encuentran tabulados el PER que corresponde a cada una de las dietas en las diferentes fases además de la relación de cada una de las dietas a caseína. En nuestro experimento se consideraron como controles a las dietas de caseína, por ser una proteína de buena calidad y de amaranto tratado térmicamente con calor húmedo, en el cual aparentemente no se dañaron los nutrientes de la semilla.

En los primeros 15 días, la dieta de mejor calidad fue indudablemente el control A, con una eficiencia alimentaria de 0.35 y un PER de 3.5 (2.5 ajustado). Sin embargo y como se ha reportado en la literatura, la calidad nutritiva del amaranto fue equiparable a caseína con una eficiencia de 0.33 y PER de 3.3 (2.4 ajustado). La dieta F₁ fue la que presentó la mejor calidad nutritiva con respecto a las dietas restantes, con un PER de 2.74 (1.99 ajustado), sin encontrarse diferencia significativa entre las dietas C₁, D₁, E₁ y G₁. La dieta H₁ fue la de menor calidad.

En la segunda etapa se encontraron cambios interesantes. En base a los valores obtenidos, A y B mantuvieron, desde el punto de vista estadístico, la misma calidad nutritiva e igual a la primera etapa. Esto es importante en nuestro experimento ya que se manejaron dos fases de experimentación, que representan dos etapas de desarrollo de las ratas distintas. La dieta D₂ fue adicionada de lisina al nivel requerido por la rata, lo que mejoró la calidad de la proteína a un nivel comparable a las dietas controles. El PER

Tabla 4.11 Relación de eficiencia protéica (PER) de cada una de las dietas en ambas fases¹

PER experimental		PER ajustado				Relación a caseína %					
A	3.46 ± 0.39	A	2.90 ± 0.32	A	2.50 ± 0.00	A	2.50 ± 0.00	A	100	A	100
B	3.31 ± 0.33	B	2.73 ± 0.37	B	2.40 ± 0.24	B	2.35 ± 0.32	B	96	B	94
C ₁	2.44 ± 0.32	C ₂	2.68 ± 0.64	C ₁	1.76 ± 0.21	C ₂	2.31 ± 0.55	C ₁	70	C ₂	92
D ₁	2.53 ± 0.29	D ₂	3.16 ± 0.20	D ₁	1.83 ± 0.21	D ₂	2.73 ± 0.18	D ₁	73	D ₂	109
E ₁	2.53 ± 0.34	E ₂	2.68 ± 0.35	E ₁	1.83 ± 0.25	E ₂	2.31 ± 0.30	E ₁	73	E ₂	92
F ₁	2.74 ± 0.23	F ₂	2.73 ± 0.69	F ₁	1.99 ± 0.19	F ₂	2.35 ± 0.60	F ₁	80	F ₂	94
G ₁	2.46 ± 0.37	G ₂	2.63 ± 0.11	G ₁	1.78 ± 0.24	G ₂	2.27 ± 0.10	G ₁	71	G ₂	91
H ₁	1.98 ± 0.19	H ₂	2.16 ± 0.25	H ₁	1.43 ± 0.19	H ₂	1.87 ± 0.22	H ₁	57	H ₂	75

¹PER ajustado = PER exp x $\frac{\text{PER caseína de referencia (2.5)}}{\text{PER dieta experimental caseína}}$

(Ver Tabla 4.8)

se elevó significativamente a un valor semejante a caseína y amaranto cocido, hecho que reveló que efectivamente sí hubo un daño a lisina por el tratamiento por contacto directo al que fue sometido. Al parecer el resto de las dietas, durante esta segunda etapa en donde se adicionaba el aminoácido limitante (dietas D₂, G₂ y H₂) o éstas se hacían deficientes en el mismo (C₂, E₂ y F₂), indistintamente se elevó la calidad de las mismas a un nivel de significancia ($p < 0.05$), por supuesto en magnitudes diferentes.

La dieta H₂ mostró ser la de menor calidad proteínica. Cabe mencionar que Betschart et al. (1981), obtuvieron un PER de 1.7 para el amaranto reventado por lecho fluidizado, menor al que se obtuvo en este trabajo.

La mortandad durante el experimento fue de 8.3%, que representa cuatro animales de un lote de 48; 3 de las ratas muertas correspondían al grupo alimentado con la dieta G y 1 rata pertenecía al grupo de la dieta H. Las causas de esta mortandad se debió a que durante el experimento enfermaron de las vías respiratorias, provocando que no consumieran alimento y de ahí su muerte.

La digestibilidad aparente de proteína, esto es sin haber hecho corrección por pérdidas metabólicas, registró durante la primera fase pérdidas similares de nitrógeno en heces (de 3.7 a 4.0%) en todas las dietas que contenían amaranto, mientras que caseína solo registró el 1.96% de excreción en heces (Tabla 4.12). El contenido de nitrógeno en las distintas dietas fue: 1.66% en la dieta A; 1.93% en la dieta B y 1.72 para las dietas restantes,

Tabla 4.12 Contenido de nitrógeno y óxido crómico en heces y digestibilidad aparente de las dietas de prueba¹

	N en heces	Cr ₂ O ₃ en heces	Digestibilidad de N aparente		N en heces	Cr ₂ O ₃ en heces	Digestibilidad de N aparente
A	1.96 ± 0.03	3.99 ± 0.00	90.53 ± 0.00 ^x	A	2.22 ± 0.00	3.45 ± 0.09	87.55 ± 0.29 ^x
B	3.78 ± 0.005	2.46 ± 0.08	74.10 ± 0.33 ^{yz}	B	3.70 ± 0.01	2.46 ± 0.04	74.98 ± 0.36 ^{yz}
C ₁	3.73 ± 0.005	2.69 ± 0.009	74.10 ± 0.84 ^{yz}	C ₂	3.58 ± 0.005	2.79 ± 0.03	78.37 ± 0.17 ^{xy}
D ₁	3.80 ± 0.003	2.65 ± 0.012	73.27 ± 0.14 ^{yz}	D ₂	3.77 ± 0.005	3.09 ± 0.02	79.38 ± 0.17 ^{xy}
E ₁	3.96 ± 0.13	2.67 ± 0.004	72.46 ± 0.46 ^{yz}	E ₂	3.88 ± 0.00	2.67 ± 0.08	75.42 ± 0.60 ^y
F ₁	3.73 ± 0.02	2.57 ± 0.008	72.94 ± 0.83 ^{yz}	F ₂	3.71 ± 0.005	2.77 ± 0.05	77.40 ± 0.34 ^y
G ₁	3.74 ± 0.01	2.58 ± 0.003	73.04 ± 0.31 ^{yz}	G ₂	3.97 ± 0.00	2.96 ± 0.06	77.36 ± 0.51 ^y
H ₁	4.00 ± 0.02	2.29 ± 0.001	67.45 ± 0.00 ^z	H ₂	3.96 ± 0.005	2.37 ± 0.08	71.67 ± 0.91 ^{yz}

¹Digestibilidad aparente de N = $100 - \left(100 \times \frac{N \text{ heces}}{Cr \text{ heces}} \times \frac{Cr \text{ alimento}}{N \text{ alimento}} \right)$

las medias seguidas de las mismas letras no difieren estadísticamente a p < 0.05 (Ver Tabla 4.8)

Tabla 4.13 Retención neta de proteínas (NPR) y utilización neta de proteínas (NPU)¹

Dieta	NPR aparente	NPU aparente	Dieta	NPR aparente	NPU aparente
A	4.52 ± 0.32 ^x	72.32 ± 5.60 ^r	A	4.17 ± 0.39 ^x	66.83 ± 5.64 ^r
B	4.26 ± 0.34 ^x	68.29 ± 5.59 ^r	B	3.80 ± 0.44 ^{xy}	60.91 ± 6.86 ^{rs}
C ₁	3.47 ± 0.25 ^{yz}	55.65 ± 3.65 st	C ₂	3.82 ± 0.60 ^{xy}	61.19 ± 8.78 ^{rs}
D ₁	3.50 ± 0.28 ^{yz}	56.00 ± 4.14 st	D ₂	4.21 ± 0.19 ^x	67.44 ± 2.82 ^r
E ₁	3.33 ± 0.52 ^{yz}	53.28 ± 8.37 st	E ₂	3.77 ± 0.25 ^y	60.32 ± 3.83 ^s
F ₁	3.82 ± 0.23 ^y	61.25 ± 3.85 ^s	F ₂	3.89 ± 0.63 ^{xy}	62.35 ± 9.65 ^{rs}
G ₁	3.33 ± 0.37 ^{yz}	53.41 ± 5.93 st	G ₂	3.89 ± 0.09 ^{xy}	61.87 ± 1.38 ^{rs}
H ₁	3.15 ± 0.19 ^z	50.37 ± 3.50 ^t	H ₂	3.46 ± 0.22 ^y	55.30 ± 3.46 ^s

¹Las medidas seguidas de las mismas letras no difieren estadísticamente a p < 0.05.
(ver tabla 4.8)

aunque el contenido de proteína cruda en todas las dietas era del 10%. Todas las dietas contenían 0.32% de Cr_2O_3 . La digestibilidad aparente resultó ser al aplicar la prueba de Duncan mayor para caseína en la primera fase (90.53%), sin encontrarse una diferencia significativa entre las dietas B, C₁, D₁, E₁, F₁ y G₁ ($p < 0.05$). La digestibilidad más baja ($p < 0.05$) la presentó la dieta H₁ (64.75%). Estos valores están de acuerdo con los ya registrados en la literatura que son de 90.8% para caseína y de 77 a 79.29 para amaranto libre de sustancias antifisiológicas (Betschart et al., 1981; Calderón de la Barca et al., 1985).

En la segunda etapa se observó que se mantuvo constante la digestibilidad aparente de las dietas A y B de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0.05$). Sin embargo, de la misma prueba estadística se puede deducir que hubo la tendencia a mejorar la digestibilidad de todas las dietas en la segunda fase, no obstante que las dietas C₂ y F₂ eran carentes de lisina y E₂ en leucina. La dieta D₂ mostró ser de todas la que mejoró en mayor medida su digestibilidad, pues aumentó de 73% en la primera fase a 79% en la segunda. Las dietas (G₂ y H₂) también tienden a mejorar su digestibilidad al adicionarles lisina en la segunda fase.

El cálculo de retención neta protéica (NPR) (Tabla 4.13) se efectuó suponiendo que las ratas pierden peso si son alimentadas con una dieta libre de nitrógeno (se considera pérdida de 1.4% día) a partir de los valores del PER experimentales. En la misma

tabla se encuentran valores de utilización neta protéica (NPU) suponiendo que la composición proteínica corporal de las ratas es del 16.0%, que al multiplicarse por el valor de NPR se obtiene el valor buscado (Mc Laughlan, 1976).

Dado que el PER no es un buen estimador de la calidad protéica de un alimento, puesto que solo considera el desarrollo del animal para su cálculo, se considera como más representativo el NPR, que toma en cuenta tanto el desarrollo del animal como el consumo de la proteína con fines de mantenimiento del mismo. Así que también en este caso se realizó, además del análisis de varianza, la prueba de Duncan para observar las diferencias en calidad nutritiva entre las distintas dietas. Este análisis mostró que las dietas A y B son de calidad protéica similar ($p < 0.05$) 4.52 y 4.26 respectivamente, lo que representa para B el 94.25% respecto a caseína que coincide con el valor de NPR reportado por Bressani (1983) de 96.0% respecto a caseína, F_1 resultó ser la dieta de mejor calidad después de los controles, sin existir diferencia significativa entre ésta y las dietas C_1 , D_1 , E_1 y G_1 . La dieta H_1 mostró ser la dieta de menor calidad de todas. Al mismo nivel de significancia ($p < 0.05$) A y D_2 resultaron ser de igual calidad nutritiva con respecto al NPR y NPU, y las mejores dietas del segundo período sin haber una diferencia significativa entre ésta y B, C_2 , F_2 , G_2 . En este período las dietas E_2 y H_2 , ambas de similar calidad, resultaron ser las que mostraron menor NPR y NPU.

Cabe señalar también que la dieta E₂ se suplementó con leucina. pese a que el aminograma reveló un alto contenido del aminoácido. Subusimos una deficiencia en el nutriente de acuerdo al valor teórico encontrado en la literatura (5.7 g de leucina/100 g de proteína) y lo llevamos al recomendado por la NAS (6.3 g de leucina por 100 g de proteína). Lo anterior con el fin de verificar si efectivamente la leucina es el aminoácido limitante del amaranto, que aparentemente no lo fue, pues no mejoró la calidad protéica por esta adición. Hay que recordar también que por el método DBL no observamos disminución de lisina reactiva para el amaranto reventado con el tratamiento de contacto directo.

También se calculó el valor biológico (BV) aparente de las distintas fuentes protéicas (Tabla 4.14), considerando el NPU estimado (no experimental) y la digestibilidad aparente (experimental), de acuerdo a la fórmula de Miller y Bender (1955). La expresión matemática funcionó para la caseína que dió un valor de 79.89, valor aproximado al teórico que es de 75 (Stare and Mc Williams, 1984).

Sin embargo, para el amaranto cocido se registró un valor de 92.16 en la primera fase; muy alto comparado al teórico que debe ser semejante al de caseína (75 ó 77) (NRC, 1984; National Institute of Nutrition, India 1983). No obstante, del trabajo de Calderón de la Barca et al (1985) para A. leucocarpus se puede deducir un BV de 93.5, que coincide con el obtenido en este trabajo. El resto de

Tabla 4.14 Valor biológico (BV) estimado de las dietas experimentales¹

Valor biológico aparente			
Dieta		Dieta	
A	79.89 ± 6.19^y	A	76.39 ± 6.47^{yz}
B	92.16 ± 7.55^x	B	81.23 ± 9.15^y
C ₁	75.11 ± 4.92^y	C ₂	78.09 ± 11.20^y
D ₁	76.43 ± 5.65^{yz}	D ₂	84.96 ± 3.55^x
E ₁	73.53 ± 11.55^z	E ₂	79.98 ± 5.08^y
F ₁	83.98 ± 5.28^{xy}	F ₂	80.55 ± 12.46^y
G ₁	73.13 ± 8.12^z	G ₂	79.97 ± 1.78^y
H ₁	74.67 ± 5.18^{yz}	H ₂	77.15 ± 4.83^y

¹Las medias seguidas de las mismas letras no difieren estadísticamente a $p < 0.05$.

las dietas que contenían amaranto acusaron BV de 73 a 76, excepto para F₁ (amaranto reventado por lecho fluidizado) que fue de 84, valor semejante al que se obtuvo para la dieta D₂ en la segunda etapa, que también fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al que había registrado en la primera etapa. Las dietas E₁ y G₁ resultaron ser las de menor BV de todo el experimento. En la segunda fase no se encontró diferencia del BV entre el amaranto y el resto de las dietas de amaranto (a pesar de que en algunos casos las dietas son limitantes en algún aminoácido esencial), excepto para la dieta D₂ que acusó el BV más alto de la segunda etapa (84.96), significativamente mayor a caseína.

Entre la primera y segunda etapas se encontró una diminución significativa en el BV del amaranto cocido y un aumento significativo en el BV de la dieta D₂ respecto a D₁ ($p < 0.05$).

CAPITULO V

DISCUSION

Eficiencia del reventado

Aún cuando no se utilizó para el reventado de la "alegría" un lecho fluidizado per se, pues lo que hizo el grupo ingenieril fue adaptar un secador de espreas para dicho fin, el rendimiento obtenido (61.5%) por este sistema, no representa una ventaja respecto al método de reventado por contacto directo (66.0%) pues en ambos métodos se está perdiendo cerca del 40% de la semilla. Claro está que, como ya se hizo mención en el capítulo de resultados, tanto la semilla tostada como reventada son aprovechadas para la elaboración de "alegrías", sin embargo, el problema no radica en el uso de la semilla sino en la calidad nutritiva de ésta, que necesariamente en la semilla tostada, si no existe un control en la temperatura aplicada, es más probable que la proteína se encuentre más dañada. Además, el dulce de "alegría" elaborado con semillas tostadas representa una pérdida económica, ya que resulta ser más barato que el que se elabora con semilla exclusivamente reventada. De cualquier manera, el sistema empleado en el reventado utilizó un flujo de aire caliente que, considerándolo de una manera rigurosa, es un sistema de lecho fluidizado que necesariamente deberá ser diseñado de tal manera que se obtengan mayores rendimientos en el reventado de la semilla, para que represente una ventaja a nivel industrial.

Cabe señalar que aún en ninguno de los métodos que se conocen

se ha logrado una eficiencia de reventado del 100%, por lo que resultaría interesante que los métodos novedosos que se empleen para el reventado logren la menor cantidad de semilla tostada. Hay que tomar en cuenta también, que el reventado de la semilla está posiblemente influido por factores propios de la semilla, como pueden ser la edad y la humedad de la misma. En la literatura revisada por nosotros no encontramos información a este respecto, por lo que sería de gran utilidad la exploración de estos factores para el mejor entendimiento del proceso de reventado.

Una de las preguntas que nos planteamos al inicio del trabajo fue el observar si la lisina se daña de igual forma en la semilla reventada que en la semilla tostada. Comparando las dietas C₂ (amaranto tostado (CD)) y E₂ (amaranto reventado (CD)), notamos que el desarrollo de las ratas fue similar y no hubo diferencia significativa en los valores de PER, NPR, NPU y BV, lo que representa que la proteína se daña de igual manera en la semilla tostada o reventada. La misma comparación no pudo realizarse con el amaranto tratado por el sistema de lecho fluidizado, pues en este caso la apariencia de la semilla tostada no resultó grata a la vista y la mayor parte de la semilla ya se había carbonizado.

El sistema de reventado por lecho fluidizado representa para los fabricantes de "alegrías" una ventaja en cuanto a que se podrían procesar de manera continua grandes volúmenes de semilla, obteniéndose iguales rendimientos que si se emplea el método tradicional.

No obstante, con respecto a la semilla tostada, si no existe un control riguroso de temperatura que evite la carbonización de la misma, no podrá emplearse en la elaboración de "alegrías" de semilla tostada, lo que representaría una pérdida económica importante para el fabricante. Una vez que haya un total entendimiento del proceso de reventado de la semilla y un mejor diseño del equipo que logre aumentar los rendimientos del reventado de la semilla, las ventajas serán mayores haciendo a este método una mejor alternativa de procesamiento de la semilla.

Correlación Lisina-Reactiva-Evaluación Biológica y Limitaciones del Método DBL como Estimador del Daño Provocado a la Lisina

No se observó correlación entre el análisis químico de lisina por el método DBL y la evaluación biológica, pues mientras que con el método químico se registró un descenso en la lisina-reactiva para el amaranto tostado (CD) del 20%; el 38% fue para el amaranto reventado por lecho fluidizado (LF) y ningún cambio para el amaranto reventado (CD).

No se detectó el mismo comportamiento en la disponibilidad in vivo de la lisina pues al evaluar las dietas que contenían estos materiales tratados (dietas: C₂ amaranto tostado (CD); E₂ amaranto reventado (CD) y F₂ amaranto reventado (LF), resultaron con PER, NPR, NPU y BV no diferentes significativamente al control de amaranto (B), hecho que coincide con las observaciones de Pellet y Young (1980) en un experimento similar y en el que encontraron que sólo se puede

observar una respuesta en el desarrollo de las ratas, si se tiene un daño muy severo en la lisina, e.g., es posible que se dañe la lisina presente en la leche, pero si el daño no es muy severo, éste no se detecta en un experimento animal hasta que el daño sea lo bastante crítico para hacer a la lisina el principal aminoácido limitante. Esto es, aunque se dañe la lisina presente en la proteína, habrá también lisina no dañada que aún puede cubrir los requerimientos del animal, aunque aparentemente la cantidad evaluada sea baja.

Lo anterior se puede explicar si se toma en cuenta que al establecer los requerimientos de un nutriente para un organismo, se tiene que considerar la variabilidad biológica de los individuos de toda la población, es por esta razón que los requerimientos de un nutriente son un promedio estadísticamente válido, que a su vez se incrementan de acuerdo a las observaciones experimentales por comites especializados, con lo que se obtiene un intervalo en el que se está seguro de satisfacer las necesidades de casi el total de la población saludable, algunos individuos requerirán menos del promedio, otros por encima de éste, sin ser ambas cantidades lo bastante críticas como para lograr un cambio significativo en el desarrollo individual. El estar por debajo del requerimiento no necesariamente implicaría una malnutrición en ese nutriente (NAS, 1980). El contexto anterior se vio apoyado en nuestras observaciones experimentales, ya que se elaboró una dieta (D) con amaranto tostado (CD) y tomando en cuenta el aminograma del mismo, se adicionó la cantidad

necesaria de aminoácidos esenciales al nivel que requiere la rata, pues algunos de ellos lo necesitan en mayor cantidad que el humano, infante ó adulto. De esta manera nos aseguramos que la única deficiencia existente en la dieta fue la lisina. En efecto, fue el único caso en el que la adición de lisina provocó un aumento de peso significativo en relación a la misma dieta pero limitante en lisina. De la misma manera, cuando se evaluaron las mezclas maíz-amaranto (dietas G y H) hubo la tendencia a un mayor desarrollo en las ratas al adicionarles lisina al nivel requerido por ellas, a una dieta que inicialmente era deficiente en lisina. El método químico parece ser entonces más sensible en la detección del daño provocado a lisina, puesto que aún un 38% de daño como el que se observó en el amaranto reventado (LF) no fue percibido por la rata. Es necesario hacer hincapié en que, aunque las evaluaciones realizadas en ratas pueden extrapolarse al humano, éstas no necesariamente deberán ser válidas (Pellet y Young, 1980), lo cual posiblemente querrá decir que en nuestro caso quizá la rata no fue el mejor modelo experimental que detectara el daño provocado a lisina.

El hecho de no encontrar una disminución en la calidad protéica del amaranto tratado térmicamente, respecto al control de amaranto sin tratamiento, nos hizo pensar en que el tratamiento térmico que se aplica en el reventado de la semilla, no es severo para el 35% de las proteínas que se encuentran en el perispermo amiláceo (Irving et al., 1981; Becker y Saunders, 1984; Sánchez-Marroquín, 1985a) y

por lo tanto, representa un daño ligero a lisina (reacciones iniciales de Maillard). El 65% de proteínas restantes localizadas en la envoltura de la semilla y que pueden llegar a tostarse por el tratamiento térmico, dará lugar además de las reacciones iniciales de Maillard a las reacciones finales del oscurecimiento no enzimático, racemización y posible entrecruzamiento de proteínas. Por lo que respecta a las primeras reacciones de Maillard, el método DBL detectará una caída en el valor de lisina-reactiva porque en este tipo de daño, en el que el compuesto predominante es la fructosillisina (Finot y Mauron, 1972), es probable que estos grupos básicos aún reaccionen con el colorante, esto sucede porque aún los grupos ϵ -amino de lisina se encuentran cargados. Sin embargo, la sustitución de este grupo impide la reacción con anhídrido propiónico, que permanecerá cargado positivamente y contribuirá a incrementar aparentemente las unidades de arginina e histidina, lo que traerá como consecuencia una disminución en lisina-reactiva. Lo anterior significa que el DBL no es sensible en la detección de las primeras reacciones de Maillard. Otra explicación de por qué el método DBL registra valores bajos de lisina-reactiva es porque las reacciones de Maillard pueden parcialmente degradarse hasta sus últimos pasos, produciendo aldehídos de las reductonas que pueden reaccionar con la lisina, haciendo menos básico el grupo ϵ -amino; Hurrell y Carpenter (1978) observaron que esto resulta en una caída drástica de lisina-reactiva. Es muy probable que las reacciones antes mencio-

nadas se dieron lugar en los materiales que utilizamos, ya que para el análisis se elaboró una harina en la cual se pusieron en contacto todos los componentes de la semilla por una ruptura de compartimentos y se mezclaron las dos diferentes fracciones protéicas provocando que en la medición se llevaran a efecto los patrones antes mencionados.

Bjarnason y Carpenter (1970) encontraron también que en condiciones severas de calentamiento (como es posible que suceda en la envoltura de la semilla, donde existe el 65% de la proteína) se da lugar a un entrecruzamiento entre las cadenas polipeptídicas, por una condensación de los grupos ϵ -amino de lisina y los grupos amidas de glutamina y asparagina, lo que trae como consecuencia que el colorante no se "ligue" con los grupos que se han condensado con los enlaces amida, además de que se da una propionilación incompleta y por consecuencia un valor bajo de DBL.

Sin embargo, nuestros hallazgos dejaron demostrado una vez más la utilidad del método en la evaluación de lisina-reactiva para la semilla de amaranto crudo y cocido, en los que se encontraron valores similares a los registrados en la literatura, pero usando el método directo de Carpenter, que dependiendo de la especie debe encontrarse en un intervalo de 5.5 a 6.5 g de lys/100 g de proteína (Tovar y Carpenter, 1982; Sánchez-Marroquín, 1983; NRC, 1984) en este trabajo se registraron 6.21 g de lys/100 g de proteína para la semilla cruda y cocida.

Para detectar las primeras reacciones del obscurecimiento no

enzimático parece ser que se puede utilizar el colorante azul de remazol, pero a pesar de que posee la misma sensibilidad que el ácido naranja 12, su uso involucra un procedimiento de 7 h comparado con 1 h máximo para los azo-compuestos (Hurrell y Carpenter, 1975).

Respuesta a la Adición de Lisina ó Leucina y Digestibilidad de Dietas

Las dietas: C₁ (amaranto tostado (CD)), D₂ (amaranto tostado (CD) adicionado de aminoácidos) y F₁ (amaranto reventado (LF)) fueron adicionadas de lisina al nivel requerido por la rata y sólo en el caso de la dieta D₂ se observó un aumento significativo en el PER, NPU, NPR y BV por la adición de lisina, en los casos restantes en sí, la adición no mejoró la calidad proteica del amaranto. Observamos sin embargo, que la misma dieta carente en lisina en una segunda fase, 15 días después de haber empezado el experimento, no provocó ninguna respuesta en el desarrollo del animal distinta a la primera fase. Este comportamiento particular se debió quizá a que el animal, a medida que va creciendo se vuelve menos exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales (NAS, 1978b), como sucede en el humano (FAO, 1973).

Al inicio del experimento durante 15 días las ratas fueron alimentadas con una dieta adicionada de lisina, para luego ser alimentadas 11 días más con la misma dieta carente en lisina. Fue evidente sobre todo en el caso del amaranto control (B), que el animal se vuelve menos eficiente en la fijación de nitrógeno a medida que va

llegando a su edad adulta, al disminuir significativamente el BV de la misma dieta en la segunda fase. Una posible explicación pudiera ser que inicialmente al haberse alimentado las ratas con el nivel de lisina óptimo, en la segunda fase aún la deficiencia no la percibe la rata, pues en dicha etapa es menos exigente para ese nutriente. Pensamos que la respuesta a la carencia de lisina ó adición de la misma hubiera sido diferente si el experimento se hubiera invertido, como en el caso de la dieta D, en el que sí se observó un mejor desarrollo del animal al adicionar lisina en la segunda fase. Nuestros hallazgos por lo tanto no concuerdan con el trabajo de Bressani (1984), en el que observó un aumento significativo en la calidad protéica del amaranto reventado-tostado al adicionar lisina.

En cuanto a la calidad nutritiva del amaranto sometido a reventado o tostado (CD) Bressani, en el mismo estudio, informa una mejora en el NPR, NPU y BV respecto al amaranto crudo. Mientras que nosotros no observamos ningún cambio significativo de estos valores pero con respecto al control de amaranto cocido, que fue equiparable a caseína. El trabajo de Bressani también evaluó el amaranto reventado (LF) que resultó ser de mejor calidad al obtener valores mayores para NPR, NPU y BV que los del amaranto reventado-tostado (CD). Nosotros encontramos que el amaranto reventado (LF) registró un NPR de 3,89 que concuerda totalmente con el informado por Bressani, pero éste comparado con el NPR del amaranto cocido (3,80) no resultó

ser de menor calidad significativamente ($p < 0.05$), También el BV de la semilla para este tratamiento (81) se observó que fue similar a casefna (BV=76) y al de amaranto cocido (81). Esto sugiere que la lisina no se daña significativamente por cualquiera de los tratamientos térmicos en seco utilizados para el reventado de la semilla, aunque el menor daño se consigue aplicando para el reventado un lecho fluidizado. Lo que concuerda además con Betschart et al. (1981) en el que reporta sólo una disminución de lisina del 15% en el amaranto reventado (LF) respecto a la semilla no tratada, con un PER de 1.7 semejante al que se obtuvo en este trabajo de 1.9.

A pesar de que en el aminograma del amaranto reventado-tostado no se detectó deficiencia en leucina, se tomó como si así lo fuera, con el fin de corroborar la limitación en este aminoácido reportado por varios autores. La adición de leucina a la dieta E no mejoró la calidad nutritiva del amaranto, e inclusive tiende a disminuir su valor nutritivo que cuando la dieta era carente en este aminoácido. Este efecto puede explicarse porque además de estar evaluando una posible deficiencia en lisina, la adición de leucina provocó un desbalance en los aminoácidos, lo que se vio reflejado en un menor consumo de alimento y un menor desarrollo de las ratas. Lo anterior se debió a que el imbalance de aminoácidos desarrolla aversión por parte de la rata hacia la dieta (Li y Anderson, 1983). La supresión en el consumo de alimento se ha descrito como una respuesta al exceso de aminoácidos individua

les (1-10% de la dieta) y en una dieta baja en proteína.

En cuanto a la digestibilidad de nitrógeno aparente, encontramos que no hubo diferencia significativa entre la digestibilidad del control de amaranto y el amaranto tratado térmicamente por los distintos métodos. La adición de aminoácidos tampoco modificó la digestibilidad aparente de la proteína. La única dieta que mejoró su digestibilidad al adicionarle lisina fue la dieta D, pues en este caso, al haber un mejor balance de aminoácidos para la rata, la proteína se puede aprovechar más eficientemente, lo que se vio reflejado en un aumento en la digestibilidad. Bressani (1984) reportó que el tratamiento térmico provocaba una disminución en la digestibilidad del amaranto así tratado, lo que no concuerda con nuestros hallazgos, ni con la información ya existente, pues mientras que nosotros encontramos una digestibilidad del 74-79%, autores como Betschar et al (1981) reportaron 77% y Calderón de la Barca et al (1985) de 79%, que concuerda con los valores por nosotros obtenidos.

Daño Directo a Aminoácidos

Tovar y Carpenter (1982) informaron que en la semilla tratada térmicamente por contacto directo hubo racemización del 5 al 15% de alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y fenilalanina, de los cuales solo este último es esencial, tanto para ratas como para humanos (Tovar y Schwass, 1983). Puesto que el 65% de la proteína se encuentra en la envoltura de la semilla, ésta por la temperatura que alcanza, que es mayor que en el resto de la semilla, es donde más proba-

blemente se racemice. A diferencia de Tovar y Carpenter, nosotros encontramos que pocos fueron los aminoácidos que no se racemizaron, siendo importante señalar que sufrieron daño la valina, leucina, fenilalanina y metionina, todos ellos esenciales tanto para rata ó humano y que el más dañado resultó ser la metionina, con un 6.4% de racemización con respecto al amaranto crudo.

La evidencia biológica de este daño se pudo observar más en la dieta D, a la que se le adicionó además de lisina; treonina, metionina, valina, isoleucina y leucina, algunos de ellos dañados por el tratamiento térmico y único caso en el que la adición de aminoácidos mejoró la calidad protéica del amaranto. Argumento que se ve apoyado en el sentido de que el resto de las dietas que contenían amaranto tratado térmicamente, a pesar de estar enriquecido con lisina y no presentar deficiencia en leucina, no mejoraron el desarrollo de las ratas, lo que indicó que el daño no sólo fue exclusivo de la lisina, sino también de otros aminoácidos.

Lo anterior también se vio reflejado cuando se suministró la dieta tal cual, ya que en este caso lo que se midió fue la calidad completa de la proteína y no el daño provocado a un solo aminoácido, pero aparentemente dicho daño no influyó significativamente en el desarrollo del animal, que no fue capaz de detectarlo. en la segunda fase experimental, cuando se vuelve menos exigente en sus requerimientos.

Hechos muy interesantes se observaron en los perfiles de amino-

ácidos de la semilla cruda de amaranto y la semilla reventada-tostada (CD). En primer lugar y con respecto a la semilla cruda, no se encontró ninguna deficiencia en aminoácidos al compararse con el patrón de FAO (1973), inclusive se pudo observar un exceso en todos los aminoácidos esenciales y en segundo lugar, cuando la semilla es tratada con calor directo, se observó que el principal aminoácido limitante fue la lisina, con desaparición total de cistina y la aparición de cuatro pécos que no fueron identificados.

Lo anterior confirma nuevamente que la lisina sí se dañó, aunque este no fue detectado por la rata. Con respecto a la cistina se ha observado que las reacciones avanzadas de Maillard pueden destruir grandes cantidades de cistina, además de lisina, i.e., que no se recuperan por hidrólisis de la proteína (Evans y Butts, 1949; Miller et al., 1965; Hurrell y Carpenter, 1977). La degradación de cistina también puede deberse al entrecruzamiento de proteínas. El calor puede causar fisión de los enlaces disulfuro, produciendo dehidroalanina que puede condensarse con cistina para formar lantionina, o con los grupos ϵ -amino de lisina para formar lisinoalanina (Carpenter, 1973; Hurrell y Carpenter, 1977; Mauron, 1981).

Karel et al. (1975) al estudiar la formación de radicales libres en proteínas, encontró que éstos pueden producirse en los átomos de azufre, de los grupos sulfhidrilo de cisteína, que a su vez pueden reaccionar con peróxidos de lípidos con la característica

de ser degradativos. La cisteína, cistina, lisina y metionina dan diferentes productos por esta degradación vía radicales libres (Tabla 2.3). No sería raro que todo el conjunto de reacciones se den lugar en la harina de amaranto tratado térmicamente y de esta manera explicarse la desaparición de cistina y la aparición de cuatro nuevos compuestos.

En relación a qué aminoácido es el limitante en la proteína de amaranto, puesto que de acuerdo a los aminogramas disponibles en este trabajo y de otras fuentes (Martine de Lespinasse, 1979; Tovar y Carpenter, 1982; Bressani, 1983), indican que no es la leucina, tanto para el amaranto crudo como procesado, pues al compararlo con el patrón de la FAO (1973), resultó ser mayor del 100%. Observamos que en el amaranto tostado-reventado se encontró una limitación en lisina con una cuenta química de 56.18 y un nulo contenido en cistina (la cistina puede substituir parte de los requerimientos de metionina (NAS, 1980)).

Autores como Martine de Lespinasse (1979) han sugerido que el principal aminoácido limitante sea el triptofano, pero Tovar y Carpenter (1982), Sánchez-Marroquín et al. (1985c) e inclusive en el presente trabajo, observamos que el triptofano se encuentra en niveles aún más elevados que en la leche, y con respecto a otros aminoácidos esenciales presentes en la proteína del amaranto, no se han encontrado deficiencias ni para el amaranto crudo ni tratado térmicamente. Bressani (1983) indicó también que en contraposición a los

de ser degradativos. La cisteína, cistina, lisina y metionina dan diferentes productos por esta degradación vía radicales libres (Tabla 2.3). No sería raro que todo el conjunto de reacciones se den lugar en la harina de amaranto tratado térmicamente y de esta manera explicarse la desaparición de cistina y la aparición de cuatro nuevos compuestos.

En relación a qué aminoácido es el limitante en la proteína de amaranto, puesto que de acuerdo a los aminogramas disponibles en este trabajo y de otras fuentes (Martine de Lespinasse, 1979; Tovar y Carpenter, 1982; Bressani, 1983), indican que no es la leucina, tanto para el amaranto crudo como procesado, pues al compararlo con el patrón de la FAO (1973), resultó ser mayor del 100%. Observamos que en el amaranto tostado-reventado se encontró una limitación en lisina con una cuenta química de 56.18 y un nulo contenido en cistina (la cistina puede substituir parte de los requerimientos de metionina (NAS, 1980)).

Autores como Martine de Lespinasse (1979) han sugerido que el principal aminoácido limitante sea el triptofano, pero Tovar y Carpenter (1982), Sánchez-Marroquín et al. (1985c) e inclusive en el presente trabajo, observamos que el triptofano se encuentra en niveles aún más elevados que en la leche, y con respecto a otros aminoácidos esenciales presentes en la proteína del amaranto, no se han encontrado deficiencias ni para el amaranto crudo ni tratado térmicamente. Bressani (1983) indicó también que en contraposición a los

datos químicos disponibles, la leucina no es el aminoácido deficiente en el amaranto y que es difícil determinar el aminoácido deficiente, ya que esta limitación dependerá del nivel de proteína que se use en la dieta, pues a menores contenidos de proteína se tienen los niveles más altos de aminoácidos limitantes, expresados como porcentaje de la proteína.

Nosotros pensamos que la metionina pudiera ser el limitante para el amaranto crudo y aunque en el aminograma que se presenta en este trabajo se da un valor alto (2.79 g/16g N), éste no refleja realmente la cantidad presente en la proteína, porque su medición no se llevó a cabo con una oxidación previa del aminoácido con ácido per fórmico. Si la metionina no se mide después de este tratamiento, la hidrólisis a la que se somete la proteína para la liberación de los aminoácidos, destruye a este aminoácido, dando valores que no representan la cantidad real de metionina. Además la metionina es uno de los aminoácidos más escasos (Stare y Mc Williams, 1984), pues aún en proteínas como las del huevo y pescado que se consideran de buena calidad, es el principal aminoácido limitante. Por esta razón, no sería raro que en el caso del amaranto también fuera la metionina el principal aminoácido limitante.

Calidad Nutritiva de las Mezclas Maíz-Amaranto

La suplementación harina de nixtamal-amaranto reventado por lecho fluidizado (50-50), resultó ser teóricamente completa en todos los aminoácidos esenciales para niño y rata, excepto en lisina,

en el que fue limitante la mezcla, con una cuenta química de 67.45. En relación a este último valor se notó que se mejoró, a pesar de todo, la calidad protéica del maíz, cuya cuenta química se ha reportado de 44 (Hansel et al, 1973). En cuanto al PER, NPR, NPU y la digestibilidad, la suplementación no mostró ser inferior ($p < 0.05$) que las dietas elaboradas con amaranto tostado (CD), pero sí ligeramente inferior que la calidad del amaranto reventado (LF). No obstante, el valor biológico fue inferior ($p < 0.05$) que para el amaranto tratado por los dos métodos térmicos. Al adicionarle lisina a la suplementación, hubo una tendencia al aumento de peso de los animales, pues hubo un ligero incremento en los valores de PER, NPR y NPU. El incremento se hizo más evidente en el BV de esta mezcla, que fue significativamente mayor al adicionarle lisina. Este hecho confirma también que la lisina se dañó por el tratamiento térmico en el sistema de lecho fluidizado, pues teóricamente el amaranto debía enriquecer completamente las deficiencias de lisina del maíz. Sánchez-Marroquín y Maya (1985b) recomiendan el enriquecimiento de tortillas con harina integral de amaranto, pues al ensayar una mezcla nixtamal-amaranto (50-50) encontraron que, además de mejorarse el contenido de proteína y grasa del maíz, las características organolépticas no sufren cambio alguno.

En cuanto a la mezcla palomitas de maíz-amaranto (50-50); durante todo el experimento resultó ser la dieta de menor calidad de todas, al presentar los valores más bajos de PER, NPU, NPR, digesti-

bilidad y BV, aunque también la adición de lisina mejoró significativamente la calidad nutritiva de la suplementación.

Cabe hacer mención que en realidad no supimos cual fue teóricamente la composición de aminoácidos del maíz palomero, pues no encontramos en la literatura esta información y se tomó en su lugar el mismo perfil que para el maíz nixtamalizado y probablemente la mezcla no resultó ser en la proporción 50-50, la que suplementara las deficiencias en aminoácidos del maíz palomero.

En resumen se puede afirmar que la adición de amaranto reventado a productos de maíz mejorará la calidad protéica de este último, elevando su valor biológico, a pesar del daño térmico que por este método sufre el amaranto.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- a) Se obtiene la misma eficiencia de reventado, tanto para el método tradicional por contacto directo, como para el sistema de lecho fluidizado, que resultó ser del 60-67%. El remanente de semilla tostada puede utilizarse (si se utilizó para ello el método tradicional) para elaborar también dulce de "alegría". No así cuando se utiliza un lecho fluidizado, pues la semilla remanente se carboniza en su mayor parte. Se sugiere por lo tanto, estudiar los factores que influyen en el reventado de la semilla de amaranto y un mejor diseño del sistema de lecho fluidizado, ya que el 40% de la semilla se está perdiendo.
- b) Durante el tratamiento térmico se obtiene una fracción reventada y otra tostada de la semilla, en las que no se afecta la proteína por el calentamiento significativamente, resultando de una calidad semejante al amaranto sometido a un tratamiento térmico húmedo.
- c) Se encontró que el amaranto sometido a cocción en agua a ebullición por 30 min, posee una calidad nutritiva semejante a caseína.
- d) El sistema de reventado por lecho fluidizado no daña significativamente a lisina y a otros aminoácidos, a diferencia del reventado por contacto directo, en donde hay la tendencia a un mayor daño; con una relación de eficiencia proteica (PER) de 2.35;

retención neta protéica (NPR) de 3.89; utilización neta de proteínas (NPU) de 62.35. Ligeramente inferior al control de caseína (PER = 2.5; NPR = 4.17; NPU = 66.83) e igual al amaranto cocido (PER = 2.35; NPR = 3.80; NPU = 60.91). En cuanto al valor biológico (81) resultó ser igual que el control de amaranto cocido (81.23) y mayor que el de caseína (76.4). El reventado o tostado por cualquiera de los métodos empleados no resultó estadísticamente diferente al control de amaranto cocido.

- e) La proteína de amaranto reventado-tostado sufre racemización del 0.4 al 6.4% en los aminoácidos esenciales: valina, leucina, fenilalanina y metionina; este último resultó ser el más dañado de los aminoácidos indispensables. Se observó un daño severo en cistina, pues desapareció totalmente del aminograma del amaranto sometido a tratamiento térmico por contacto directo y la aparición de cuatro nuevos compuestos que no fueron identificados, pero que se presume pueden ser lisinoalanina (LAL), lantionina o productos de degradación de cistina, cisteína, lisina o metionina con hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados. Asimismo, se observó un decremento en lisina del 59% respecto a la semilla cruda.
- f) El método de "colorante ligado a lisina" (DBL), resultó ser un método más para utilizarse en la evaluación de lisina-reactiva en el amaranto crudo o cocido, con la ventaja de ser más rápido y barato que el método directo de Carpenter, que utiliza

fluorodinitrobenzeno (FDNB); siendo comparables los resultados obtenidos con los que se encuentran en la literatura.

- g) En el caso en el que las semillas de amaranto se someten a un tratamiento térmico por contacto directo, o por un sistema de lecho fluidizado, el método DBL no resultó ser un buen estimador del daño provocado a lisina, pues mientras que la proteína localizada en el revestimiento de la semilla sufre un daño severo, la proteína que se encuentra en el perispermo amiláceo sufre un daño ligero, en el que predominan las reacciones iniciales de Maillard, donde el método resulta insensible. Hecho que no permitió el uso del método DBL con fines de monitoreo y estimación del daño provocado a lisina por el tratamiento térmico.
- h) En relación al inciso anterior, no fue posible encontrar una correlación entre la evaluación química de lisina y su evaluación biológica.
- i) La suplementación harina de nixtamal 50% - amaranto reventado por lecho fluidizado 50%, resultó ser teóricamente completa en todos los aminoácidos esenciales para niños y ratas, excepto en lisina en el que fue limitante la mezcla, con una cuenta química de 67.45, superior a la del maíz sólo, que es de 44, por lo que la adición de amaranto reventado por lecho fluidizado a productos de maíz, mejora la calidad proteica de este último, al elevar su valor biológico.

- j) Aparentemente la leucina no fue el aminoácido limitante en el amaranto, pues no mejoró la calidad protéica de una dieta adicionada de leucina al nivel requerido por la rata. Además, la proteína de amaranto se encuentra por arriba de los niveles de aminoácidos recomendados por la FAO (1973) para niños a juzgar por los aminogramas presentados en este trabajo.
- k) La digestibilidad de nitrógeno aparente no se modificó cuando el amaranto se sometió a los distintos tratamientos térmicos, en relación al control de amaranto cocido, que acusaron valores de digestibilidad del 74 al 79%.

APENDICE 1

DESCRIPCION DEL EQUIPO EMPLEADO

En la Fig. A.1 se puede apreciar la manera mediante la cual se adaptó un dispositivo a un secador por aspersión para el reventado de la semilla de amaranto, aplicando un fluido de aire caliente (SLF). El equipo está integrado por los siguientes aditamentos:

- (A) Cámara de secado de acero inoxidable 304, formada por una sección cilíndrica de 94 cm de diámetro interior por 152 cm de alto y fondo cónico a 60°, al final termina en una boca de descarga de 10 cm de diámetro. En esta sección cónica se localiza la entrada de aire caliente. La cámara está aislada con lana de vidrio y con envolvente exterior de acero de 96.5 cm de diámetro.
- (G) Dispositivo adaptado para la operación de reventado que se colocó en la boca de descarga. Este dispositivo, que se puede apreciar con más detalle en la Fig. A.2, consiste en un ducto de forma acampanada que permite ajustarse a la descarga del aire caliente (J) que entra al secador. Este conducto soporta en su sección cilíndrica a una malla de acero inoxidable con abertura de 1/16". En este dispositivo se alimenta la corriente de aire caliente que entra en contacto con las semillas depositadas de manera continua desde una tolva de abastecimiento (H) que se encuentra colocada en el techo del secador. La alimentación de las semillas se efectúa controlando su descarga con una válvula

de compuerta (I) y mediante un tubo de cobre que descarga encima de la malla.

- (C) Ventilador centrífuga que alimenta el aire caliente en forma inducida a través de los conductos de acero inoxidable. Este ventilador está equipado con un motor de 1/2 CP para corriente de 220 V. El aire es calentado por tres juegos de bancos de resistencia eléctrica (E).
- (K) Termostato para el control de temperatura.
- (L) Termómetro de carátula que mide la temperatura de salida del aire.
- (B) Ciclón conectado a recipientes sellados (D) para coleccionar la semilla reventada.

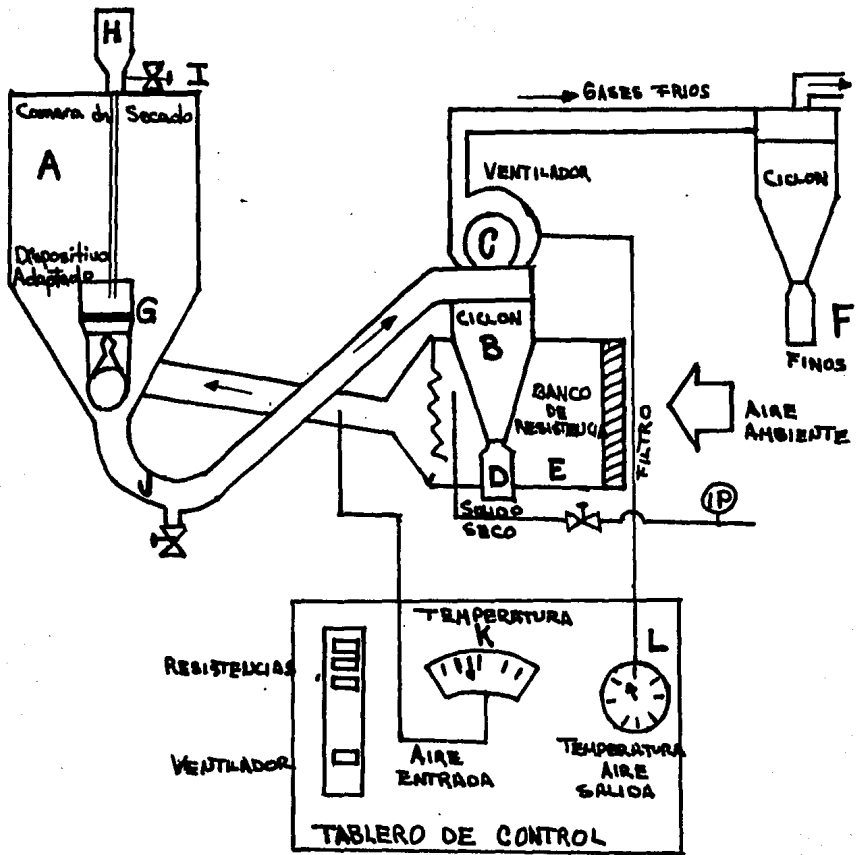


Figura A.1 Reventador de semillas por lecho fluidizado, adaptado a un secador por aspersión.

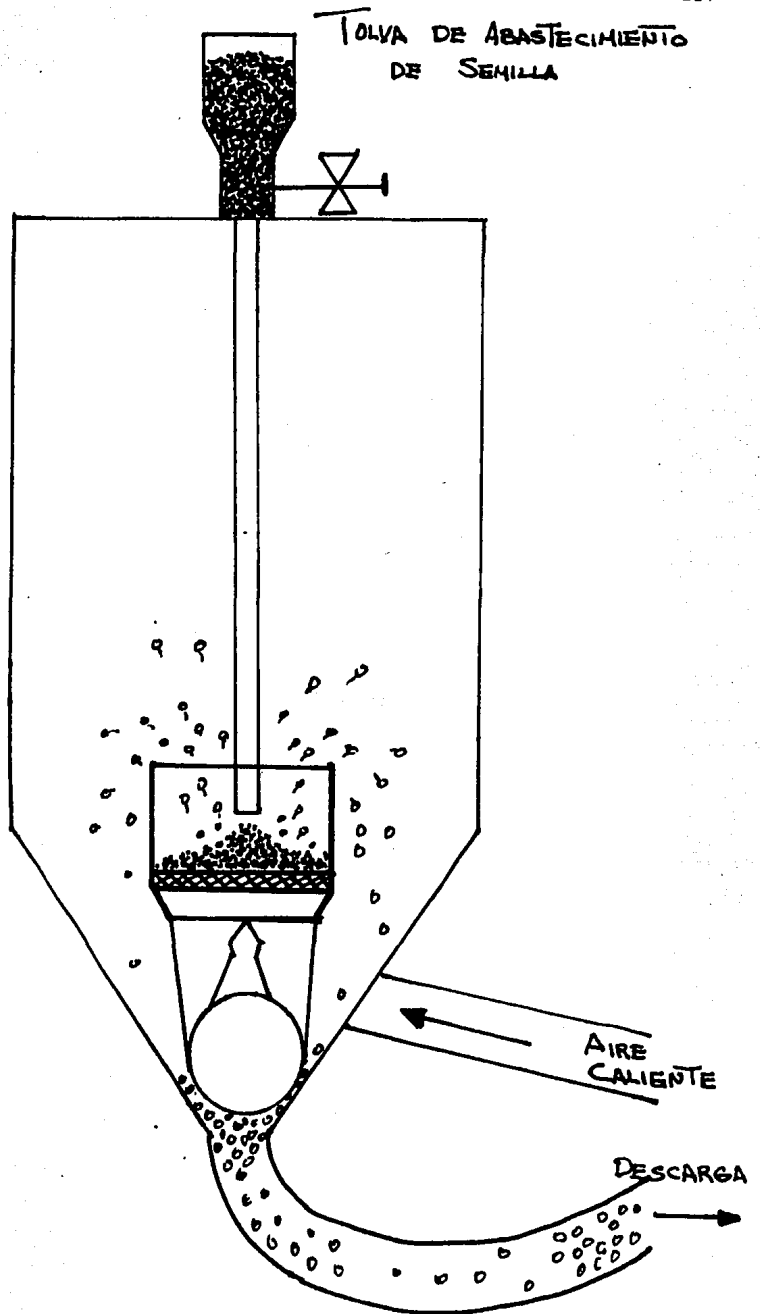


Figura A.2 Detalle del dispositivo para el reventado de las semillas.

APENDICE 2

Para calcular la cantidad adecuada de muestra en el método DBL, se debe de tener presente que para la lectura "A" se requieren 40 ml de solución colorida de 3.89 mmol/l, lo que representa 0.156 mmol en este volúmen. Para obtener lecturas adecuadas, la concentración final de colorante deberá estar en un rango de 1.3 - 1.7 mmol/l. Puesto que el volúmen es de 45.3 ml, éste corresponde de 0.059 a 0.077 mmol remanentes. Se desea estar en el centro de este rango, i.e., en 0.068 mmol, lo que significa una absorbancia de 0.151 - 0.068 = aproximadamente 0.08 mmol de colorante. Posteriormente se necesita calcular el peso de muestra que contenga este número de moles en grupos aminos, de acuerdo al aminograma de la proteína en cuestión.

Para ilustrar el cálculo se tomó como ejemplo la harina de soya.

	<u>g</u>		
	<u>16g N</u>	<u>P.M.</u>	<u>mmoles/16g N</u>
Arginina	7.23	174	41.55
Histidina	2.52	155	16.26
Lisina	6.08	146	<u>41.64</u>
			99.45

Por lo tanto, si 100g de proteína cruda contienen 99.45 mmoles, los 0.08 mmoles que se requieren están contenidos en:

$$\frac{0.08}{99.45} \times 100 \times 1000 = 80.4 \text{ mg de proteína cruda.}$$

Si la muestra contuviera 47% de proteína cruda, entonces del material se tomarían:

$$80.4 \times \frac{100}{47} = 171 \text{ mg de harina de soya para la muestra "A".}$$

Para la muestra "B" no se considera el valor de lisina (puesto que se elimina con la propionilación) y los cálculos se realizan como sigue:

$$\frac{0.08}{(41.55 + 16.26)} \times 100 \times 1000 \times \frac{100}{47} = 294 \text{ mg de material.}$$

Si al leer las absorbancias de las muestras "A" ó "B" las concentraciones son menores de 1.3 mmoles/l, entonces el peso del material debe reducirse. Por el contrario, si la concentración está por arriba de 1.7 mmoles/l, el peso debe incrementarse (Hurrell et al., 1979).

AIN (1977). Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. J. Nutr. 107, 1340-1348.

Anderson, G.H.; Ashley, D.V.M. and Jones, J.D. (1976). Utilization of L-methionine sulfoxide, L-methionine sulfone and cysteic acid by the weanling rat, J. Nutr. 106, 1108-1114.

Anónimo (1979). Amarantho: planta rica en proteínas adaptable a diferentes climas. México indígena 30, 13-14.

Anónimo (1983). Studies on the nutritional quality of grain amaranths. Nutr. Rep. Internat. 28, 1445-1456.

AOAC (1980). Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemistry. Published by the Association of Analytical Chemistry. Washington, D.C.

Becker, R.; Wheeler, E.L.; Lorenz, K.; Stafford, A.E.; Grosjean, O. K.; Betschart, A.A. and Saunders, R.M. (1981). A compositional study of amaranth grain. J. Fd. Sci. 46, 1175-1180.

Becker, R. and Saunders, M.R. (1984). Amaranthus: a potential food and feed resource. Adv. in Cereal Science and Technology. Vol. 6, cap. 6. pp. 421-423.

Bender, A.E. and Doell, B.H. (1957). Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. Br. J. Nutr. 11, 138-143.

Bender, E.F.; Douglass, W.L. and Kramer, A. (1982). Statistical methods for food and agriculture. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, U.S.A. pp. 87-124.

- Betschart, A.A.; Irving, D.W.; Shepherd, A.D. and Saunders, R.M. (1981). Amaranthus cruentus: Milling characteristics, distribution of nutrient within seed components, and the effects of temperature on nutritionally quality. J. Fd. Sci. 46, 1181-1187.
- Boctor, A.M. and Harper, A.E. (1968). Measurement of available lysine in heated and unheated foodstuffs by chemical and biological methods. J. Nutr. 94, 289-296.
- Bressani, R. (1983). Calidad proteínica de la semilla de amaranto cruda y procesada. En: El amaranto y su potencial. Boletín 3. Publicado por la oficina de Archivos Latinoamericanos de Nutrición. INCAP, Guatemala, Guatemala, C.A.
- Bressani, R. (1984). Efecto del procesamiento térmico húmedo o seco sobre la calidad proteínica del grano de amaranto. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Guatemala. En: Memorias del Primer Seminario Nacional de Amaranto. Vol. I, pag. 88-104.
- Bressani, R. and Scrimshaw, N.S. (1958). Effect of lime treatment on in vitro availability of essential amino acids and solubility of protein fractions in corn. J. Agr. Fd. Chem. 6, 774-778.
- Bruner, J.R. (1976). Characteristics of edible fluids of animal origin; milk. In: Principles of Food Science, Part I Food Chemistry, (Fennema, O. ed) pp. 325 Marcel Dekker, New York.
- Bjarnason, J. and Carpenter, K.J. (1970). Mechanisms of heat damage in proteins. 2.- Chemical changes in pure proteins. Br. J. Nutr. 24, 313-329.

- Calderón de la Barca, A.M.; Ochoa, J.L. and Valencia, M.E. (1985). Effect of the extraction of hemagglutinin on the nutritive value of Amaranthus leucocarpus seeds. *J. Fd. Sci.* 50, 1700-1702.
- Carpenter, K.J. and Ellinger, G.M. (1956). Protein quality and available lysine in animal products. *Poultry Sci.* 34, 1451-1452.
- Carpenter, K.J. (1960). The estimation of available lysine in animal-protein foods. *Biochem. J.* 77, 604-610.
- Carpenter, K.J. (1973). Damage to lysine in food processing: Its measurements and its significance. *Nutr. Abstr. Rev.* 43, 423-451.
- Carlsson, R. (1980). Quantity and quality of Amaranthus grain from plants in temperate, cold and hot, and subtropical climates. In: *Proceedings of the Second Amaranth Conference. Emmaus, PA.* Rodale Research Press, Inc. pp. 48-58.
- Cervantes, J.M.; Riquelme, V. y González, S. (1983). Evaluación de la paja de alegría (Amaranthus hypochondriacus) como alimento para rumiantes. Centro de Ganadería, Colegio de posgraduados, Chapingo, México. Publicado en: *Memorias de la XVI Reunión de la Asociación Mexicana de Producción Animal, Chapingo, México.*
- Chatterjee, S.R. and Abrol, Y.P. (1977). Protein quality evaluation of popped barley grain (sattu). *J.Fd. Sci. Tech.* 14, 247-250.
- Clark, A.V. and Tannenbaum, S.R. (1974). Isolation and characterization of pigments from protein-carbonyl browning systems. Models for two insulin-glucose pigments. *J. Agr. Fd. Chem.* 22, 1089-1093.

Coons, M. (1977). The status of Amaranthus hybridus, L. in South America. Ciencia y Naturaleza. Revista del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Central del Ecuador (Quito, Ecuador). Vol. XIX y XX, 81-87.

Corrêa, A.D. y Jokl, L. (1984). Estudios de la composición química, factores antinutricionales y contenido proteínico de algunas semillas de Amaranthus sp. En: El amaranto y su potencial. Boletín 4. Publicado por la oficina de Archivos Latinoamericanos de Nutrición, INCAP, Guatemala, Guatemala, C.A.

Couch, J.R. and Thomas, M.C. (1976). A comparison of chemical methods for the determination of available lysine in various proteins. J. Agr. Fd. Chem. 24, 943-946.

Dansky, L.M. and Hill, F.W. (1952). Applications of the chromic oxide indicator method to balance studies with growing chickens. J. Nutr. 47, 449-459.

Downton, W.J.S. (1973). Amaranthus edulis: a high lysine grains amaranth. World Crops. 25, 20.

Eldred, N.R. and Rodney, G. (1946). The effect of proteolytic enzymes on raw and heated casein. J. Biol. Chem. 162, 261-265.

Evans, R.J. and Butts, H.A. (1949). Inactivation of aminoacids by autoclaving. Science. 109, 569-571.

FAO/WHO (1973). Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. Rome, 22 march - 2 april. Food and Agriculture Organization. Published by FAO and WHO, Nutrition Meeting Report Series. 52, 118.

Finley, J.W. (1985). Environmental effects on protein quality. In: Chemical changes in food during processing. IFT Basic Symposium Series. Ed. T. Richardson and J.W. Finley. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut. pp. 443-483.

Finot, P.A. and Mauron, J. (1972). Inactivation of lysine by the Maillard reaction. II. Chemical properties of lysine N-(1-deoxy-1-D-fructosyl) and N-(1-deoxy-1-D-lactulosyl) derivatives. *Helv. Chim. Acta* 55, 1153-1164.

Finot, P.A. (1973). Proteins in human nutrition. J.W.G. Porter and B.A. Rolls eds. Academic Press, New York. (No se registraron las páginas).

Ford, J.E. and Shorrocks, C. (1971). Metabolism of heat-damaged proteins in the rat. Influence of heat damage on the excretion of amino acids and peptides in the urine. *Br. J. Nutr.* 26, 311-322.

Frankel-Conrat, H. and Cooper, M. (1944). The use of dyes for the determination of acid and basic groups in proteins. *J. Biol. Chem.* 154, 239-246.

Gardner, H.W. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. *J. Ag. Fd. Chem.* 27, 220-229.

Grubben, G.T. (1975). La culture de l'Amarante légume-feuilles tropical. Wageningen, Pays Bas. pag. 54.

Hansel, L.W. (1973). The effect of the fluory-2 gene on the distribution of protein fractions and methionine in maize endosperm. *Cereal Chem.* 50, 383-394.

Harper, A.E. (1981). McCollum and directions in the evaluation of protein quality. *J. Agr. Fd. Chem.* 29, 429-435.

Hayase, F.; Kato, H. and Fujimaki, M. (1975). Racemization of amino acids residues in proteins and poly(L-amino acids) during roasting. *J. Agr. Fd. Chem.* 23, 491-494.

Hodge, J.E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agr. Fd. Chem.* 1, 928-943.

Hurrel, R.F. and Carpenter, K.J. (1975). The use of the three dye-binding procedures for the assessment of heat damage to food proteins. *Br. J. Nutr.* 33, 101-115.

Hurrel, R.C.; Carpenter, K.J.; Sinclair, W.J.; Otterburn, M.S. and Asquith, R.S. (1976). Mechanism of heat damage in proteins. VII. Significance of lysine-containing isopeptides and of lanthionine in heated proteins. *Br. J. Nutr.* 35, 383-395.

Hurrel, R.F. and Carpenter, K.J. (1977). Nutritional significance of cross-link formation during food processing. In: Symposium on protein cross-linking nutritional and medical consequences. Ed. M. Friedman Plenum Press. pp 225-238.

Hurrel, R.F. and Carpenter, K.J. (1978). The digestibility and lysine values of proteins heated with formaldehyde or glucose. *J. Agr. Fd. Chem.* 26, 796-801.

Hurrel, R.F.; Lerman, P. and Carpenter, K.J. (1979). Reactive lysine in foodstuffs as measured by a rapid dye-binding procedure. *J. Fd. Sci.* 44, 1221-1227.

Irving, D.W.; Betschart, A.A. and Saunders, R.M. (1981). Morphological studies on Amaranthus cruentus. J. Fd. Sci. 46, 1170-1174.

Kakade, M.L. (1974). Biochemical basis for the differences in plant protein utilization. J. Agr. Fd. Chem. 22, 550-555.

Kakade, M.L. and Liener, I.E. (1969). Determination of available lysine in proteins. Anal. Biochem. 27, 273-280.

Karel, M.; Schaid, K. and Roy, R.B. (1975). Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino acids. J. Agr. Fd. Chem. 23, 159-163.

Keith, H. (1979). Reviving the food of the azteca. Science News 116, 168-169.

Lakin, A.L. (1973). Evaluation of protein quality by dye-binding procedures. In: Proteins in Human Nutrition. Academic Press, London, pp. 179.

Lea, C.H. and Hannan, R.S. (1950). Reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. 3. Nature of the protein groups reacting. Biochem. Biophys. Acta. 5, 532-534.

Li, E.T.S. and Anderson, G.H. (1983). Amino acids in the regulation of food intake. Nutr. Abs. Rev. 53, 169-181.

Lien, Y.C. and Nawar, W.W. (1974). Thermal decomposition of some aminoacids. Valine, leucine and isoleucine. J. Fd. Sci. 39, 911-913.

Macazaga, O.C. (1985). Diccionario de antropología mesoamericana. Ed. Innovación, S.A. México. pag. 30, 223.

- Martineau, J.R. (1985). Resumen agronómico del amaranto de grano. Descripción botánica. En: El amaranto y su potencial. Boletín 4. Publicado por la oficina de Archivos Latinoamericanos de Nutrición. INCAP, Guatemala, Guatemala, C.A.
- Martine de Lesspinasse, M.J. (1979). Estudio del valor nutritivo y determinación de la actividad de los factores antifisiológicos de la semilla de Amaranthus leucocarpus wats (alegría). Tesis de licenciatura. Universidad Iberoamericana, México, D.F.
- Marx, J.L. (1977). Amaranth: A comeback for the food of the aztecs? Science 198, 40.
- Mauron, J. (1972). Protein and amino acid functions. E.J. Bigwood, ed. Pergamon Press, Oxford. pp. 283.
- Mauron, J. (1981). The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint. *Fd. Nutr. Sci.* 5, 5-35.
- Mc Laughlan, J.M. (1976). The relative nitrogen utilization method for evaluating protein quality. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 59, 42-45.
- Mc Rae, J.C. and Armstrong, D.G. (1969). Studies on intestinal digestion in the sheep. I. The use of chromic oxide as an indigestible marker. *Br. J. Nutr.* 23, 15-23.
- Miller, D.S. and Bender, A.E. (1955). The determination of the net utilization of proteins by shortened method. *Br. J. Nutr.* 9, 382-388.
- Miller, E.L.; Carpenter, K.J. and Milner, C.K. (1965). Availability of sulfur amino acids in protein foods. III. Chemical and nutritional changes in heated cod muscle. *Br. J. Nutr.* 19, 547-564.

Moore, S.; Spackman, D.H. and Stein, W.H. (1958). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. Anal. Chem. 30, 1185-1190.

Mossberg, R. (1968). Evaluation of protein quality by dye-binding: a tool in plant breeding. FAO/IAEA Panel for new approaches to breeding for plant protein improvement. Rostanga, Sweden. pp 151.

National Academy of Sciences (1978a). Control of diets in laboratory animal experimentation. From ILAR News. Vol. XXI, No. 2, Winter-Spring, Washington, D.C.

National Academy of Sciences (1978b). Nutrient requirements of domestic animals. Nutrient requirements of laboratory animals. Third revised edition. The National Research Council. Washington, D.C. No. 10, p. 23.

National Academy of Sciences (1980). Recommended Dietary Allowances National Academy Press. Washington, D.C. 9th Ed. pp. 43-45.

National Institute of Nutrition, India (1983). A note on the nutritive value of amaranth seeds. Fd. Chem. 12, 287-289.

National Research Council (1984). Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. National Academy Press. Washington, D.C.

Nesheim, M.C. and Carpenter, K.J. (1967). The digestion of heat damaged-protein. Br. J. Nutr. 21, 399-411.

Ortiz de Montellanos, B.R. (1978). Aztec cannibalism: An ecological necessity? Science, 200, 611-617.

Osborne, T.B.; Mendel, L.B. and Ferry, E.L. (1919). A method of expressing numerically the growth promoting value of proteins. J. Biol. Chem. 37, 223-229.

Pellet, P.L. (1973). Methods of protein evaluation with rats. XV. In: J.W.G. Porter and G.A. Rolls, eds. Proteins in Human Nutrition. Academic Press, New York and London. pp 225-244.

Pellet, P.L. and Young, V.R. (1980). Nutritional evaluation of protein foods. The United Nations University. pp. 41-57.

Pieniazek, D.; Rakowska, M. and Kunachowicz, H. (1975). The participation of methionine and cysteine in the formation of bonds resistant to the action of proteolytic enzymes in heated casein. Br. J. Nutr. 34, 163-173.

Pronczuk, A.; Pawlowska, D. and Bartnik, J. (1973). Effect of heat treatment on the digestibility and utilization of proteins. Nutr. Metab. 15, 171-180.

Rivas, T.A.S. (1985). Elaboración de una papilla infantil por extrusión a base de amaranto (Amaranthus sp) y maíz (Zea mays). Tesis Fac. de Química UNAM, México, D.F.

Rose, W.C. (1957). The aminoacids requirements of adult man. Nutr. Abs. Rev. 27, 631-647.

Roach, A.G.; Sanderson, P. and Williams, D.R. (1967). Comparison of methods for the determination of available lysine value in animal and vegetable protein sources. J. Sci. Ed. Agr. 18, 274-278.

Roubal, W.T. (1970). Trapped radicals in dry lipid-protein systems undergoing oxidation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 47, 141-144.

Rutle, J. (1976). Amaranth the gentle giant. *Farming* 23, 106-110.

Sánchez-Marroquín, A. (1980). Potencialidad agroindustrial del amarantho. Monografía. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. México, D.F.

Sánchez-Marroquín, A. (1983). Two forgotten crops of agroindustrial importance amaranth and quinoa. *Arch. Latinoam. Nutr.* 33, 11-32.

Sánchez-Marroquín, A; Maya S. and Domingo, M.V. (1985a). Milling procedures and air classification of amaranth flours. *Arch. Latinoam. Nutr.* 35, 621-629.

Sánchez-Marroquín, A and Maya, S. (1985b). Industrial corn flour enrichment with whole amaranth flour and milling fractions in corn-based products. *Arch. Latinoam. Nutr.* 35, 519-535.

Sánchez-Marroquín, A.; Maya, S. and Domingo, M.V. (1985c) Effect of heat treatment and milling on the seed, flour, rheology and baking quality of some amaranth ecotypes. *Arch. Latinoam. Nutr.* 35, 603-619.

Satterlee, L.D. and Chang, K.C. (1984). Protein deterioration. Processing effects on essential amino acids. *Fd. Develop.* 33, 50-53.

Saunders, P.M.; Becker, R. (1984). Amaranthus: A potential food and feed resource. *Adv. Cereal Sci. and Tech.* 6, 357-396.

Senft, J.P. (1980). Protein quality of amaranth grain. In: Proceeding of the Second Amaranth Conference. Emmaus, P A. Rodale Research Press Inc. pp. 43-47.

Schürch, A.F.; Lloyd, L.E. and Crampton, E.W. (1950). The use of chromic oxide as an index for determining the digestibility of a diet. J. Nutr. 11, 629-636.

Skogberg, D. and Richardson, T. (1979). Preparation and use of an enzyme electrode for specific analysis of L-lysine in cereal grains. Cereal Chem. 56, 147-152.

Stare, J. and McWilliams, M. (1984). Living Nutrition. John Wiley & Sons. 44th ed. pp. 113-118.

Sugimura, T. and Nagao, M. (1979). Mutagenic factors in cooked foods. CRC Crit. Rev. Toxicol. 100, 44-49.

Sumar, K.L. (1983). El pequeño gigante. En: El amaranto y su potencial. Boletín 2. Publicado por la oficina de Archivos Latinoamericanos de Nutrición. INCAP. Guatemala, Guatemala, C.A.

Takayama, S.; Hirakawa, T.; Tanaka, M.; Kotoh, Y. and Sugimura, T. (1979). Transformation and neoplastic development of hamster embryo cells after exposure to tryptophan pyrolysis products in tissue culture. In: Naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis. E.C. Miller editor. University Press, Baltimore, MD. p. 15.

Tannenbaum, S.R. (1979). Nutritional and safety aspects of food processing. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. pp. 153-207.

Teutonico, R.A. and Knorr, D. (1985). Amaranth: Composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Fd. Tech.* 39,49-59.

Tomarelli, R.M.; Yuhas, R.J.; Fisher, A. and Weaver, J.R. (1985). An HPLC method for the determination of reactive (available) lysine in milk infant formulas. *J. Agr. Fd. Chem.* 33, 316-318.

Tovar, L.R. (1981). The effects of treatment with alkali on the nutritional characteristics of proteins. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.

Tovar, L.R.; Barrios, T. y Valdivia, M.A. (1984). Fuentes de suplementación o sustitución en tortillas de maíz: Amaranthus hypochondriacus y Sorghum vulgare. En: Memorias del Primer Seminario Nacional de Amarantho. Vol. I pag. 193-199.

Tovar, L.R. and Carpenter, K.J. (1982). The effects on alkali-cooking of corn and supplementation with amaranth seed on its deficiencies in lysine and tryptophan. *Arch. Latinoam. Nutr.* 32, 961-972.

Tovar, L.R. and Kaneda, K. (1977). Studies on the toxicity of the autoxidized oils. VI. Comparative toxicity of secondary oxidation products in autoxidized methyl linoleate. *Yukagaku*, 26, 169-172.

Tovar, L.R. and Schwass, D.E. (1983). D-amino acids in processed proteins: their nutritional consequences. In: Xenobiotics in foods and feedstuff. ACS Symposium Series 234. J. W. Finley and D. E. Schwass (editors). Am. Chem. Soc. Washington, D.C. pp. 169-185.

Uzo, J.O. and Okorie, A.U. (1983). Amaranthus hybridus: A potential grain crops for west Africa. Nutr. Rep. Internat. 27, 519-524.

Valle-Riestra, J.F. and Barnes, R.H. (1970). Digestion of heat-damaged egg albumin by the rat. J. Nutr. 100, 873-882.

Varnish, S.A. and Carpenter, K.J. (1975). Mechanisms of heat damage in proteins. 6. The digestibility of individual amino acids in heated and propionylated proteins. Br. J. Nutr. 34, 339-349.