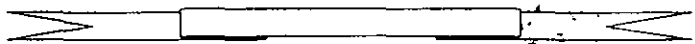


9  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA **EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA**

“OBTENCIÓN DE POLLO DESHIDRATADO PARA  
ELABORAR ALIMENTOS DE BAJO COSTO Y  
ALTO VALOR NUTRITIVO”

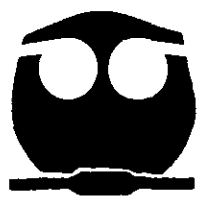
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO DE ALIMENTOS**

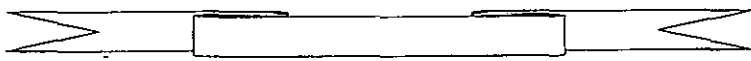
P R E S E N T A

**NORBERTO ELIEL CATALAN GARCIA**



MÉXICO, D.F.

1999.



**TESIS CON  
FALLA DE CRICEN**

270356



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Sotelo López Angela
Vocal	Prof. Lucas Florentino Bernardo
Secretario	Prof. Casillas Gómez Francisco Javier
1er. Suplente	Prof. Cornejo Barrera Lucia

Esta tesis se realizó en el Laboratorio 111, del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química

Asesor: Angela Sotelo López

---

CatGa

Sustentante: Norberto Eiel Catalán García

### **A mis padres**

Por su apoyo inigualable durante el tiempo que hemos estado juntos. Logrando así una meta propuesta hace 24 años de ver a su primer hijo con una carrera profesional y logros importantes en su vida.

### **A mis hermanas**

Por su cariño brindado en los buenos y en los malos tiempos.

### **A Frida**

Por ser el complemento en mi forma de ver y sentir todo lo que nos rodea.

A **Arturo Izazaga** por brindarme su amistad desde que éramos unos niños.

A **Marcos Ordaz** por su amistad brindada sin pedir nada a cambio.

A mi **Abuelita Angelina**, espero que sea un orgullo ver a tu primer nieto titulado. Gracias por todo.

A Alfonso G., Abigail N., Cesar V., Erika F., Fernando I., Iliana M., Mayra P., Patricia V., Rubén A., Silvia E. y Silvia A.

Agradecimientos:

- Agradezco el apoyo siempre recibido por parte la M. en C. Angela Sotelo y del Doctor Rafael Castillo.
- A los profesores Bernardo Lucas, Leticia Gil y a Hugo Sousa (*en memoria*).
- A todo el personal del laboratorio, por haber hecho de este un lugar agradable para trabajar.
- Finalmente a toda la gente que de una u otra forma ayudo a la realización de esta tesis y que pudiera estar omitiendo.

## Recompensa Anticipada

Olvidemos hoy la prisa  
La frecuencia del tráfico diario  
Deja que arome nuestra estancia  
El recuerdo del maíz  
La quietud de los gestos habituales  
Y el vaho de nuestras evoluciones.

Llegar a entender esta suerte de  
Sólo mirarnos  
Ha de ser  
La única preocupación.

Observa como  
Las familias se unen  
Como se conocen las amistades fraternales  
El amor lleno de júbilo  
El día soleado  
Los átomos de comportamientos exactos  
Los días transcurridos.  
Todos los elementos obran a favor.

Deja hoy los dioses sin atributos.  
Deben reservarnos algún dolor oculto  
Por esta recompensa  
Anticipada.

# INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN	i
OBJETIVOS	iii
I. GENERALIDADES	1
I.A. POLLO	1
I.A.1 Producción de pollo en México	1
I.A.2 Producción de pollo en el Mundo	5
I.A.3 Valor nutritivo del pollo	7
I.B. ALGUNOS ASPECTOS DE NUTRICIÓN INFANTIL	11
I.C. CALIDAD PROTEÍNICA	15
I.C.1 Métodos químicos para la evaluación de proteínas	19
I.C.1.1 Computo químico	19
I.C.1.2 Digestibilidad in vitro (DIV)	22
I.C.1.3 Disponibilidad de aminoácidos	23
I.C.1.4 Método de lisina disponible	23
I.C.1.5 Determinación de triptófano	24
I.C.2 Métodos biológicos para la evaluación de proteínas	24
I.C.2.1 Métodos basados en la variación del peso corporal	25
I.C.2.1.1 Razón de eficiencia proteínica (REP)	25
I.C.2.1.2 Razón de proteína neta (RPN)	26
I.C.2.1.3 Eficiencia de retención de proteína (ERP)	26
I.C.2.2 Métodos basados en el balance de nitrógeno	27
I.C.2.2.1 Digestibilidad aparente y verdadera (DA y DV)	27
I.C.2.2.2 Valor biológico	28
I.C.2.2.3 Utilización neta de la proteína (UNP)	28
I.C.2.2.4 Utilización de la proteína por el hígado (UPH)	29
I.C.3 MÉTODOS QUE UTILIZAN DISTINTOS NIVELES PROTEÍNICOS	29
I.D. CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS DE LOS POLVOS	30
I.D.1 Propiedades físicas	30
I.D.1.1 Humedad	30
I.D.1.2 Densidad	31
I.D.2 Pruebas de reconstitución de polvos	31
I.D.2.1 Solubilidad	32
I.D.2.2 Volumen de sedimentación	32
I.D.3 Pruebas reológicas	32
I.D.3.1 Angulo de reposo	33
I.D.3.2 Velocidad de flujo	33
II METODOLOGÍA	34
II.A DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
II.A.1 Listado de componentes y elección	34
II.A.2 Obtención de ingredientes y desarrollo de diagramas de secado	34
II.A.3 Proceso de elaboración	34
II.B ANÁLISIS PROXIMAL	39
II.C ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	39
II.D DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS	40

II.E	DETERMINACION DE CALIDAD PROTEÍNICA POR MÉTODOS BIOLÓGICOS	41
II.F	ANÁLISIS FÍSICO	41
III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
III.A	ANÁLISIS PROXIMAL	42
III.B	ANALISIS MICROBIOLÓGICOS	45
III.C	DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS	46
III.D	DETERMINACION DE CALIDAD PROTEÍNICA POR MÉTODOS BIOLÓGICOS	49
III.E	ANÁLISIS FÍSICO	55
IV	CONCLUSIONES	59
V	RECOMENDACIONES	59
VI	ANEXOS	60
VI.A	ANÁLISIS PROXIMAL	60
VI.A.1	Humedad	60
VI.A.2	Cenizas	61
VI.A.3	Proteína	62
VI.A.4	Grasa cruda	64
VI.B.	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	65
VI.B.1	Mesófilos aerobios	65
VI.B.2	Coliformes	68
VI.B.3	Escherichia coli	71
VI.B.4	Salmonella	72
VI.B.5	Staphylococcus aureus	73
VI.B.6	Hogos y levaduras	75
VI.C	DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS	76
VI.C.1	Determinación de aminoácidos por autoanalizador con columna de intercambio iónico	76
VI.C.2	Determinación colorimétrica de triptofano	82
VI.D	PRUEBAS BIOLÓGICAS	84
VI.D.1	Razón de eficiencia proteínica	84
VI.D.2	Digestibilidad Aparente	88
VI.E	ANÁLISIS FÍSICOS	89
VI.E.1	Densidad aparente	89
VI.E.2	Pruebas de reconstitución	90
VI.F.2.1	Volumen de sedimentación	90
VI.F.2.2	Solubilidad	91
VI.F	PRUEBAS REOLÓGICAS	92
VI.F.3.1	Angulo de reposo	92
VI.F.3.2	Velocidad de flujo	93
VII	BIBLIOGRAFÍA	94



## INDICE DE FIGURAS

<b>I</b>	<b>GENERALIDADES</b>	<b>Página</b>
I.A.1.1	Producción Mundial de pollo 1990 – 1995	2
I.A.1.2	Distribución del pollo en el mercado nacional	4
I.A.1.3	Proceso de producción de pollo	4
I.A.2.1	Producción mundial de pollo	5
I.A.2.2	Los 10 países que más importan pollo en el ámbito mundial	6
I.A.2.3	Los 10 países que más importan pollo en el mundo	6
<b>II</b>	<b>METODOLOGIA</b>	
II.A	Diagrama del desarrollo experimental	38
<b>III</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
III.A.3	Composición porcentual de las muestras obtenidas	43
III.D.5	Curva de crecimiento (Crecimiento acumulativo (g) Vs. Tiempo en días)	54
<b>VI</b>	<b>ANEXOS</b>	
VI.B.1.1	Diagrama para el recuento de microorganismos mesófilos	67
VI.B.2.1	Diagrama para el recuento de microorganismos por dilución en tubo. Prueba presuntiva	69

## INDICE DE TABLAS

### I GENERALIDADES

	Página	
I.A.3.1	Contenido de colesterol y esteroides en pollo y vísceras crudas	8
I.A.3.2	Composición química de pechuga y pierna de pollo sin piel	9
I.A.3.3	Composición aminoacídica de pechuga y pierna de pollo sin piel	10

### III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.A.1	Composición proximal de las muestras obtenidas. Base Húmeda	42
III.A.2	Composición proximal de las muestras obtenidas. Base Seca	42
III.A.4	ANOVA de los análisis proximales obtenidos	43
III.B.1	Análisis microbiológicos de las muestras obtenidas	45
III.C.1	Composición de aminoácidos de las muestras obtenidas	47
III.C.3	Calificación química FAO / OMS 1973	48
III.D.1	Análisis proximal de la caseína	49
III.D.2	Fórmula basal de las dietas para las pruebas biológicas	50
III.D.3	Valores de razón de eficiencia proteínica (REP)	51
III.D.4	ANOVA de REP (Sin ajuste)	51
III.D.6	Digestibilidad de las dietas elaboradas a partir de la fuente proteínica en estudio	55
III.E.1	Resultados de densidad aparente	55
III.E.2	Resultados de las pruebas de reconstitución	57
III.E.3	Resultados de las pruebas reológicas	57
III.E.4	Estabilidad al calor	58

### VI ANEXOS

VI.B.2.2	Número más probable	70
VI.C.1	Preparación de soluciones reguladoras de pH para el autoanalizador	78

## **INTRODUCCIÓN:**

En la actualidad la utilización de materias primas o ingredientes deshidratados en formulaciones alimenticias tiene un mayor impacto en la Industria Alimentaria, en donde la calidad, disponibilidad y la ergonomía han impulsado el éxito de dichos productos.

El pollo es uno de los recursos alimenticios agroindustriales más abundantes en México, al igual que otros como el huevo, carne de bovino, miel, etc. El procesamiento y modificación, amplían los campos de estudio e interés por parte de las empresas mexicanas aumentando así el mercado nacional, mayor competencia y una alternativa alimenticia de desarrollo de nuevos productos con características específicas para poblaciones con regímenes alimenticios especiales.

La razón por la cual se prefiere deshidratar pollo antes que otro alimento de alto valor proteínico, es que este producto está enfocado principalmente a los problemas de nutrición que sufre nuestro país como son los niños que son uno de los llamados comúnmente grupos vulnerables y ancianos, en donde el tratamiento empírico que se ha optado en hospitales es la utilización de dietas a partir de pollo y algún cereal como maíz, arroz, garbanzo, y otros complementos alimenticios existentes en el mercado; sin embargo la utilización de estas dietas no es aplicable en todo nuestro país, sobre todo en el interior de la república, en donde no existen los recursos adecuados para la elaboración de estas dietas o la suplementación con productos proteínicos ya existentes, así que, simplificar el proceso utilizando únicamente los ingredientes deshidratados, facilitaría su uso y aprovechamiento de acuerdo a las necesidades reales.

Uno de los usos que se pueden mencionar está enfocado a la relación existente entre la desnutrición y las enfermedades infecciosas, ya que es la principal causa de muerte en los niños menores de cinco años en México. La infección por sí sola siempre representa algún riesgo, sin embargo, cuando está asociada al tipo y grado de desnutrición, el riesgo de muerte es mucho mayor. Es decir, que a mayor grado de desnutrición y menor edad, mayor es el riesgo de enfermedad y muerte. Se ha observado que en niños con desnutrición aumenta el riesgo de muerte por diarrea de un

12 % a un 21 % y que la deshidratación eleva la letalidad a un 42 %. En niños desnutridos, la diarrea y las bronconeumonías tienen un riesgo de mortalidad 67 % mayor a los casos sin deficiencias alimenticias significativas. Estas cifras muestran el significado de tener en un hospital la disponibilidad de un producto para nutrir a un sector importante de casos como este, por ejemplo, en donde el pollo deshidratado puede funcionar perfectamente como un concentrado proteínico que facilitaría la recuperación del niño desnutrido.

Otra de las razones importantes de la deshidratación del pollo y en específico de la pechuga de pollo, ya que es esta la de mayor contenido de proteínas, es que no únicamente puede ser utilizado en hospitales o industrias especializadas en regímenes especiales, si no que, también puede ser utilizado en las Industrias Alimentarias como un aditivo, ya sea para aumentar el contenido proteínico, para darle sabor o simplemente cumplir normativamente.

Dentro de las ventajas que se pueden mencionar de la obtención de este tipo de producto se encuentran las siguientes:

- El secado de pollo funciona como un método eficaz de conservación ya que prolonga notablemente la vida de anaquel del producto, ya que disminuye la actividad acuosa.
- Logra mantener el producto una calidad nutritiva e higiénica constante, así, el consumidor siempre adquiere un producto con características uniformes.
- Un producto deshidratado siempre permite una mayor facilidad de manejo, almacenaje y transporte ya que el peso de mismo se reduce considerablemente al sufrir un procesamiento en el que se elimina la mayor cantidad de agua, lo que trae como consecuencia que los costos de estas operaciones se abatan significativamente.
- Al ser un producto de alto valor proteínico su uso y versatilidad es aumentada.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Desarrollar la tecnología adecuada para la obtención de pollo deshidratado que servirá de base para la elaboración de productos de alto contenido proteínico y de bajo costo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar los parámetros de calidad (químico, microbiológico y nutricional) de la harina de pechuga de pollo deshidratada obtenida.
- Conocer el comportamiento físico de la harina de pechuga de pollo
- Sugerir usos posibles de la harina de pechuga de pollo en la Industria Alimentaria.
- Establecer los usos que se le pueda dar a la harina de pechuga de pollo obtenida.
- Determinar la vida de anaquel del producto obtenido
- Enfocar el uso de la harina de pechuga de pollo obtenida para la elaboración de dietas ricas en proteínas enfocadas a niños desnutridos y fórmulas geriátricas.
- Observar la relación entre el tipo de secado y las propiedades nutricionales, físicas y químicas del producto obtenido por los diferentes tipos de secado.

## **I.- GENERALIDADES:**

### **I.A POLLO**

Para los investigadores, el pollo que actualmente conocemos fueron las aves salvajes conocidas con los nombres científicos de *Gallus Bankiva* y *Gallus Ferrugineus*, los cuales fueron domesticados probablemente en Asia hace 4,000 años. Desde entonces estas aves fueron teniendo cambios en su hábitat como también han tenido cambios físicos.

Las aves domésticas que el hombre explota hoy día se han clasificado en *Gallinaceas* (gallo, guajolote y pavo real), *Palmipedas* (pato, ganso y cisne) y *Columbidas* (palomas). <sup>41</sup>

#### **I.A.1 Producción de pollo en México.**

México afortunadamente es uno de los países que se encuentra a la vanguardia en la industria avícola a nivel mundial, en donde día a día se han eficientado los factores que inciden en la calidad de la carne de pollo y en su precio, facilitando así su comercialización futura.

En México existen varias razas de pollo que se explotan dentro de las cuales se puede mencionar la Arbor Acres, Aviam Farm, Hybro, Hubbard, Indian River, Paterson, Ross y Shaver Star-Bro , como las más comunes. En general estas razas han sido mejoradas genéticamente en países desarrollados, ya que en nuestro país no existe la infraestructura necesaria. Estos trabajos han logrado reducir el ciclo de engorda de catorce semanas a menos de ocho semanas, acortando los ciclos de producción y mejorando el factor de conversión.

La diferencia entre un negocio y otro radica en la eficiencia con que se realiza este proceso, para lo cual se debe invertir en programas de mejoramiento genético, nutricional, sanitario y alternativas de uso en sus productos.

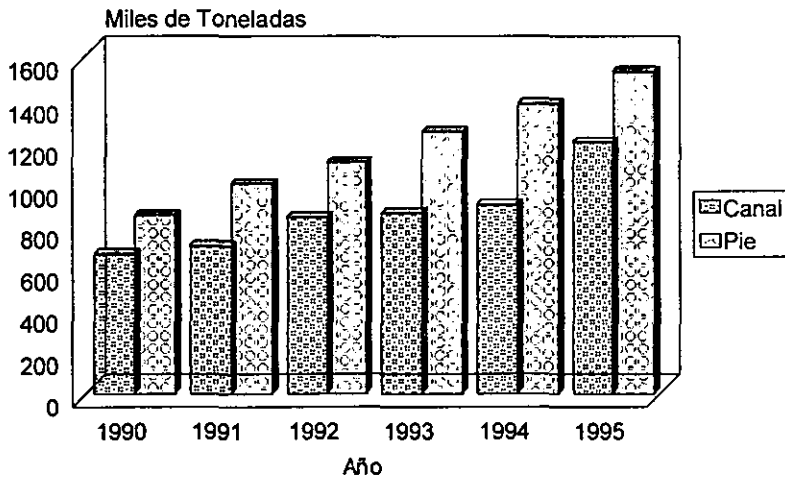
Dado que el costo de alimentación representa alrededor del 65 % del costo total de producción de pollos, éste es un factor en el que se debe poner especial cuidado. En esta área los avicultores mexicanos han avanzado a pasos agigantados, ya que

actualmente se cuenta con importantes adelantos tecnológicos para la preparación y suministro del alimento, lo que permite reducir los costos por desperdicio y al mismo tiempo mejorar el aprovechamiento de estos.

Dentro de los principales grupos avícolas que existen en México se pueden mencionar los siguientes, donde cabe mencionar que son los que se distribuyen la producción nacional.

- Univasa
- Grupo Pecuario San Antonio
- Bachoco
- Pilgrim´s Pride
- Grupo Trasgo
- Sanjor
- Mama Gallina

Figura I.A.1.1 Producción Nacional 1990 – 1995 <sup>41</sup>



La avicultura nacional se ha enfocado básicamente al abasto interno debido a los controles a las importaciones en su mayoría de tipo sanitario, impuesto por los Estados Unidos, los países de la Unión Europea y Brasil, quienes realizan el 85 % de las ventas mundiales de carne de pollo.

A raíz del TLC es importante reconocer la invasión de productos alimenticios en el mercado nacional, dentro de los cuales se encuentra el pollo y otras de sus formas de comercialización como está dentro de ellos el pollo deshidratado, presentaciones como nuggets, embutidos, potenciadores de sabor a partir de carne de pollo, aislados proteínicos, grasa animal deshidratada, etc. Si se utilizara esta forma de comercialización, se evitaría la dependencia de vender pollo con bajos márgenes de utilidad, abarcando otros sectores del mercado con mayor valor agregado y precios que permitan una mayor rentabilidad.

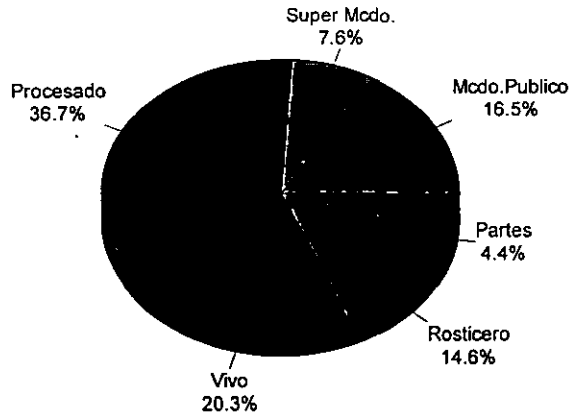
Es necesario entonces darle un valor agregado al pollo, si en verdad somos autosuficientes y con la capacidad de exportarlos. Al firmarse el TLC, se fijó un periodo de diez años para que los productos estadounidenses ingresen libremente a México, esto significa que solo tenemos 5 años para que los grandes gigantes de la producción mundial de pollo y sus productos puedan irrumpir con sus productos en nuestro territorio.

En México no obstante desde 1992 se emitió la Norma Mexicana de Carne de Ave de Engorda en Canal (NMX-FF-80-1992), misma que se refiere a todas las características físicas que debe contar el pollo de engorda en canal, en estado fresco listo para consumo humano, en la actualidad no se respeta dicha norma, y se está elaborando un anteproyecto de la Norma de Bienes y Servicios, Carne, Vísceras y Despojos Comestibles y Especificaciones Sanitarias (NOM-000-SSA-1995).

Dentro de esta producción nacional la comercialización juega un papel importante, ya que cabe destacar, que el principal uso que se le da al pollo que se produce en nuestro país es en el área de la Industria Alimentaria como se muestra en la siguiente gráfica. <sup>41</sup> (Fig. I.A.1.2)

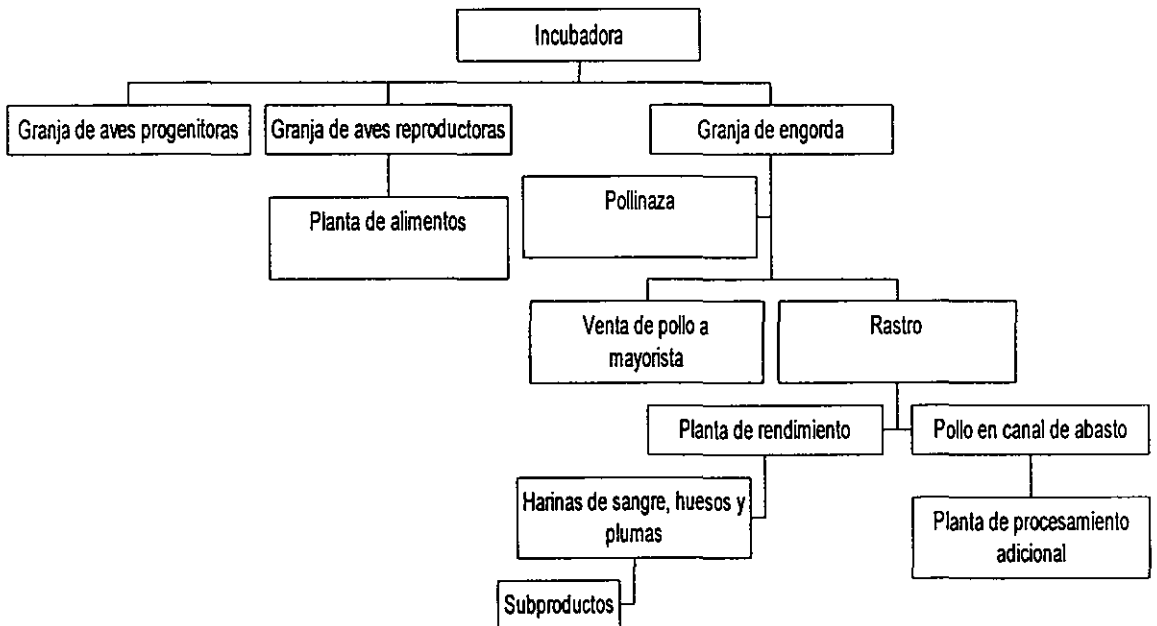


Figura I.A.1.2. Distribución del pollo en el mercado nacional <sup>41</sup>



Para que el pollo llegue a las manos de los consumidores o de las empresas que lo utilizan como materia prima, es necesario que siga la siguiente secuencia de obtención de carne de pollo (fig. I.A.1.3).

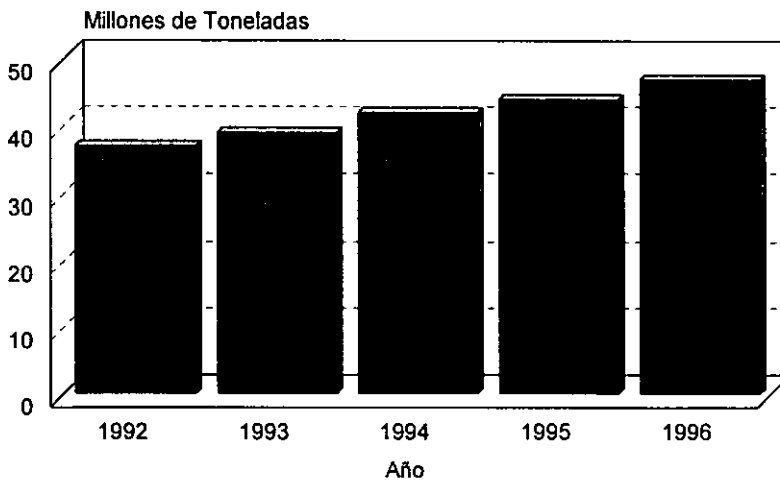
Figura I.A.1.3. Proceso de Producción de Pollo <sup>41</sup>



## I.A.2 Producción de Pollo en el Mundo

La avicultura ha desempeñado un papel importante en la economía de los países, dado que la cría de gallinas, tanto para consumo de su carne, como para la producción de huevo, les brinda una fuente de divisas. En el mundo ha sido tan importante el crecimiento de la producción de pollo, que algunos países se han dedicado a la especialización en la cría de estos animales, alcanzando 6 % más cada año en su producción (fig. I.A.2.1).<sup>42</sup>

Figura I.A.2.1 Producción Mundial de Pollo<sup>42</sup>



Uno de los aspectos que se deben recalcar en la producción mundial es saber que países tienden a importar pollo para satisfacer sus necesidades, ya sea para consumo directo o para la transformación de la materia prima para otros productos alimenticios. En las figuras I.A.2.2 y I.A.2.3 se observan la posición que ocupa México ante todo el mundo, lo que nos hace pensar y afirmar nuestra capacidad de transformar la Industria Avícola para lograr así una expansión mayor y por consecuencia una economía creciente.

Figura I.A.2.2 Los 10 países con mayor producción de pollo en el ámbito mundial <sup>42</sup>

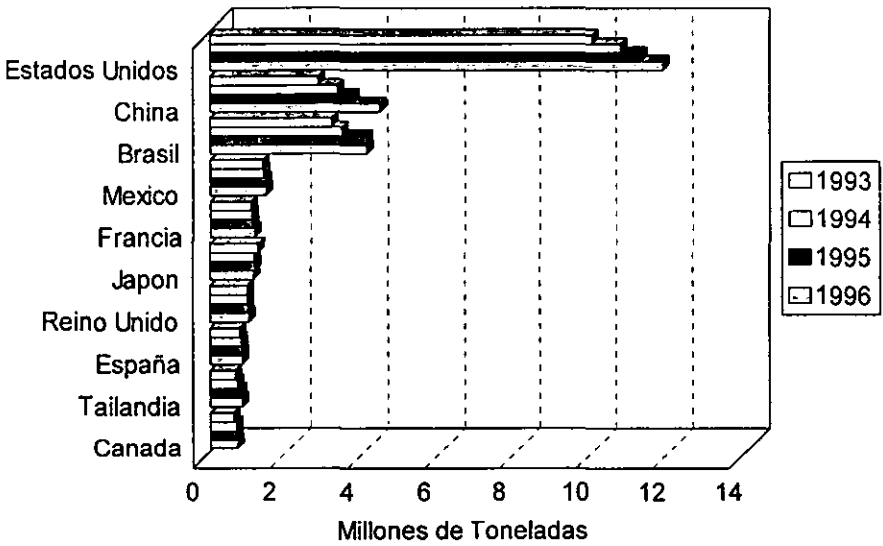
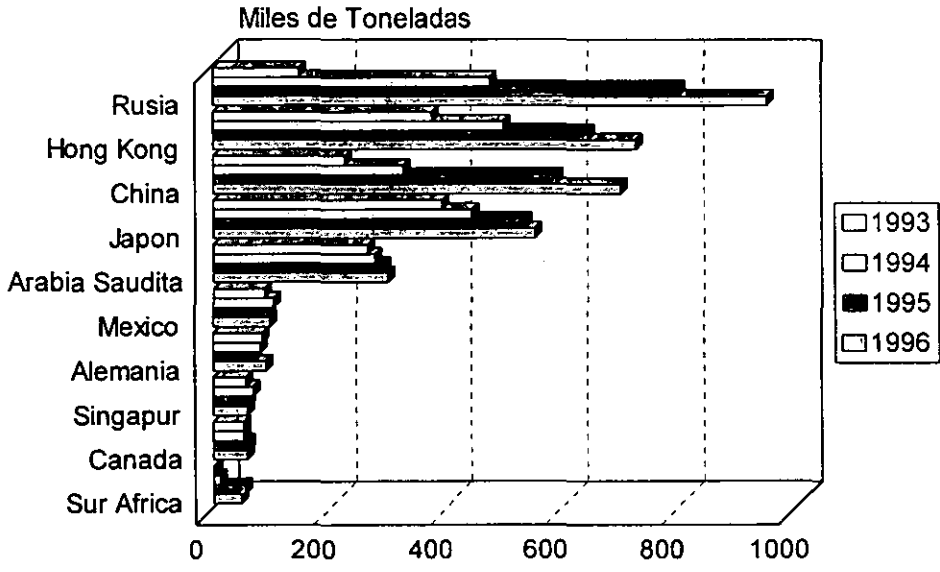


Figura I.A.2.3 Los 10 países que más importan pollo en el mundo. <sup>42</sup>



En este caso se puede observar que México a pesar de que es un país con alta producción de pollo, no alcanza a cubrir todas sus necesidades con este, ya que no se ha desarrollado la tecnología para producir aquí lo que en verdad importamos, como es el caso de potenciadores cárnicos a base de pollo, concentrados proteínicos de origen animal, grasa animal, harinas para alimentos de animales, etc.

### **I.A.3 Valor nutritivo del pollo**

Dos factores han influido para que la demanda de carne de pollo se haya incrementado a partir de las décadas de los 80s: la situación económica del país y los cambios en los hábitos alimenticios de la población, que exigen productos con menor contenido de grasas.

En el primer caso los precios comparativos del kilogramo de carne, indican que la carne de pollo mantiene un precio menor al de las carnes de cerdo y res. Si consideramos que la composición de nuestra población en su mayoría de escasos recursos económicos, se explica la orientación por el consumo de carne de ave. En lo referente a los hábitos de consumo, no solo en nuestro país sino a nivel mundial, se está dando la reorientación de los consumidores por sustituir la carne y en general los productos con alto contenido en grasa por los que no lo tienen.

El incremento de las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares hacen que estas se consideren un problema de salud pública debido a la alta tasa de mortalidad que ellas generan. Aun cuando en los últimos años esas tasas de mortalidad tienden a estabilizarse, estadísticas recientes de la OMS muestran que las enfermedades cardiovasculares fueron responsables de unos 5.8 millones de muertes en 1990 en el mundo industrializado occidental. De ahí se hace necesario desarrollar estrategias preventivas con el fin de disminuir o minimizar uno de los factores de alto riesgo, como es el colesterol ingerido con los alimentos, el cual esta relacionado con el incremento de la incidencia de estas enfermedades ya que producen una elevación del colesterol sérico.<sup>48</sup>

La carne de pollo contiene más proteína y menos grasa que la carne roja, además de ser una buena fuente de minerales (sodio, calcio, magnesio) y vitaminas en

especial del complejo B. El pollo también tiene todos los aminoácidos indispensables que el hombre necesita para su desarrollo como se puede observar en las tablas I.A.3.2 y I.A.3.3, la grasa que tiene la carne de pollo son principalmente triglicéridos y en menor cantidad fosfolípidos, los ácidos grasos que contiene son principalmente el oleico y palmítico.<sup>21</sup>

Estudios recientes han comprobado la baja cantidad de colesterol, determinando que la pechuga de pollo es la mejor para personas con problemas vasculares como se puede observar en la tabla de contenido de colesterol determinado por cromatografía de gases.<sup>48</sup>

Dentro de los factores que son más utilizados para la utilización de proteínas de origen animal en vez de las proteínas de origen vegetal esta la biodisponibilidad de los aminoácidos y por supuesto la cantidad que estos se encuentran en la matriz alimentaria.

Tabla I.A.3.1 Contenido de colesterol y esteroides en pollo y vísceras crudas<sup>48</sup>

Muestra	Promedio de Colesterol (mg/100g)	Promedio de Fitoesterol (mg/100g)
Muslo sin piel	73.70 ± 2.77	ND
Pechuga	28.81 ± 1.87	ND
Ala de pollo	69.15 ± 2.34	ND
Hígado	293.55 ± 6.23	ND
Corazón	44.89 ± 2.37	ND
Molleja	195.60 ± 5.50	ND
Piel	89.21 ± 0.79	ND

Tabla I.A.3.2 Composición química de pechuga y pierna de pollo sin piel <sup>13</sup>

Componentes (g/100 g de muestra) <sup>a</sup>	Pierna	Pechuga
Humedad <sup>b</sup>	(72.4) <sup>c</sup> 4.9	(72.4) <sup>c</sup> 4.8
Base Seca		
Cenizas	5.4	2.9
Grasa	19.7	10.7
Proteína	74.9	86.4
Fibra	***	***
Carbohidratos	***	***
Minerales ( mg/100 g de muestra seca)		
Sodio	222.27	162.77
Potasio	761.61	966.54
Zinc	9.55	2.90
Hierro	6.10	5.00
Calcio	46.53	22.74
Fósforo	588.93	687.44

<sup>a</sup> Promedio de dos determinaciones

<sup>b</sup> Humedad contenida en las piezas de pollo cocido y seco

<sup>c</sup> Humedad inicial en las piezas de pollo

Tabla I.A.3.3 Composición aminoacídica de pechuga y pierna de pollo sin piel <sup>13</sup>

Aminoácido	Patrón FAO/WHO <sup>b</sup>	Pechuga	Pierna
Treonina	4.00	3.81	3.70
Valina	4.96	4.46	3.00
Metionina + Cisteína	3.52	3.73	3.36
Isoleucina	4.00	2.19	2.94
Leucina	7.04	5.36	6.14
Fenilalanina + tirosina	6.08	5.65	6.54
Lisina	5.44	8.01	7.86
Triptofano	0.96	1.28	1.17
Histidina		2.27	2.10
Arginina		5.58	5.52
Acido Aspártico		9.20	7.17
Serina		3.65	3.65
Acido Glutámico		11.55	10.75
Glicina		2.37	4.00
Alanina		3.39	5.18
Aminoácido Limitante		Iso	Val
Cuenta Química <sup>c</sup>		55	73

<sup>a</sup> Gramos por cada 16 g de N. Promedio de dos determinaciones

<sup>b</sup> FAO / OMS 1973

<sup>c</sup> Cuenta Química = aminoácido en la muestra / aminoácido patrón \* 100

## I.B

### ALGUNOS ASPECTOS DE NUTRICIÓN INFANTIL

La desnutrición proteínico - energética es un término que se ha utilizado para definir situaciones clínicas, como los casos de los estados de desnutrición extremos llamados *Kwashiorkor* y *Marasmo* que son poco frecuentes y se observan entre niños de 1 año a los seis años de vida y de 3 - 11 meses. Las características clínicas del *Kwashiorkor* indican que todos los sistemas están alterados, en especial este tipo de desnutrición se observa cuando se presentan edemas, cambios en la piel, uñas, ojos y boca; además que puede existir hepatomegalia, también se pone de manifiesto la reducción de potasio y el aumento de sodio, las respuestas de tipo inmune se reprimen, la masa eritrocitaria se disminuye, baja el nivel de seroalbúminas y se puede presentar factores adicionales como la hipotermia y la presencia de púrpura. En el caso de *Marasmo* que es más frecuente en niños menores de 1 año, las características clínicas que se presentan en este caso son la disminución del tejido adiposo subcutáneo, la piel es más delgada, existe atrofia muscular, existe una disminución física y psicomotora pero principalmente es el detenimiento del crecimiento. Los factores que aumentan la mortandad en este tipo de desnutrición, se deben a que no existe un equilibrio osmótico debido a alteraciones renales.

Existe otro tipo de desnutrición que es ligera en cuestión proteínico - energética cuya principal manifestación identificable en los niños es el retraso del crecimiento.<sup>46</sup>

Como ejemplo de este tipo de desnutrición ligera, están los niños preescolares de siete años de edad en Brasil, los cuales de acuerdo con el patrón de altura para niños de siete años, están por debajo de este entre 3.5 cm y 4 cm de altura.<sup>60</sup>

A diferencia de otras enfermedades importantes asociadas a aspectos nutricionales, la desnutrición proteínica - energética es una deficiencia de macronutrientes y no de micronutrientes. Actualmente se acepta que la desnutrición de este tipo esta más asociada a la ingesta insuficiente de carbohidratos que de proteínas.

Existe otra clasificación del Dr. Gómez (1956) que se basó en el peso corporal del niño para su edad, esta clasificación esta aceptada mundialmente, sin embargo se



tienen que tomar en cuenta factores como son, la composición corporal, crecimiento y desarrollo físico.<sup>46</sup>

Normal	110 - 91	% del peso corporal para la edad
Desnutrición de primer grado	90 - 76	% del peso corporal para la edad
Desnutrición de segundo grado	75 - 60	% del peso corporal para la edad
Desnutrición de tercer grado	< 50	% del peso corporal para la edad

La desnutrición infantil continúa, siendo un problema que necesita de una solución urgente en los países de tercer mundo, puesto que afecta el recurso más valioso de un país los niños.<sup>44</sup>

La desnutrición proteínica es debida al déficit de disponibilidad y alto costo de los alimentos, siendo uno de los más serios problemas de malnutrición en familias de bajos recursos con niños, ya que limita su desarrollo intelectual.<sup>50</sup>

Cuando la desnutrición infantil es grave y ocurre precozmente en la vida del niño, se afectan diversas áreas del desarrollo psicobiológico. En el estudio de funciones cognitivas específicas se ha descrito la presencia de dificultades en atención, memoria en habilidades espaciales y de organización intersensorial y en otros casos, se ha observado un menor desarrollo del lenguaje. Otros resultados obtenidos en pruebas cognitivas con niños desnutridos, estos tienen menor rendimiento en memoria visual de corto plazo, en resolución de problemas y en el tiempo de reacción en la prueba de atención. Estas diferencias podrían estar indicando que la desnutrición temprana tendrá efectos sobre funciones cognitivas básicas.<sup>44</sup>

La solución de los problemas nutrimentales que afectan a amplios sectores de la población de los países en desarrollo, es compleja y escapa de los marcos de la nutrición y alimentación, sin embargo existen variados intentos de carácter localizados que tratan de aminorar el daño, en espera de mejores condiciones para eliminar la raíz de la desnutrición infantil.<sup>5</sup>

*Por este motivo, en muchas partes del mundo se están haciendo intentos para producir alimentos infantiles de bajo costo y alto contenido de proteínas. El planteamiento de suplementos alimenticios económicos y nutricionalmente aceptable*

*para los niños, solo es posible si el producto y el balance tradicional se adoptan a la cultura nativa.*<sup>50</sup>

Es por ello que utilizando los productos regionales de mayor importancia en cada país se han realizado esfuerzos para utilizarlos, como es el caso del maíz en México, de yuca en Brasil, papa en Perú y de muchos otros recursos naturales disponibles.<sup>51</sup>

La alimentación especializada para enfermos como modalidad terapéutica, ha recibido gran atención en los últimos años. La intolerancia a la lactosa constituye uno de los trastornos de mayor incidencia en el país en los lactantes y niños menores de cinco años. Generalmente conduce a la aparición de un síndrome de diarrea aguda que de no ser controlado puede generar la desnutrición y depresión del sistema inmunológico.<sup>8</sup>

El evento primario de la diarrea aguda es la infección bacteriana, viral o parasitaria, deficiencias enzimáticas congénitas o adquiridas, la intolerancia alimentaria a la lactosa o a las proteínas de la leche que sigue tras el episodio infeccioso puede conducir a la diarrea persistente con presentación de fallo de medro y malnutrición severa. El cuadro clínico descrito supone la administración de un alimento que excluya las proteínas y lactosa de la leche, que posea baja osmolalidad y altas calorías.<sup>11</sup>

Esta situación suele obedecer a la hipolactasia, con la consecuente hidrólisis defectuosa de la lactosa. Esta situación es frecuente en pacientes con desnutrición avanzada, en quienes la restricción en cuanto al empleo de leche, si bien puede acortar la duración de la diarrea, con frecuencia se traduce en desmedro tisular grave, y ser causa de muerte.<sup>52</sup>

Las fórmulas médicas o terapéuticas para intolerantes a lactosa cumplen una función muy importante dentro de la nutrición infantil, este tipo de fórmulas por una parte son el vehículo de todos los nutrimentos que el lactante requiere, y por otro lado ayudan a desvanecer algún trastorno prevalente, como puede ser el caso de la intolerancia transitoria a la lactosa, padecimiento muy frecuente en la población infantil mexicana, derivado principalmente de infecciones gastrointestinales y manifestada por problemas de tipo diarreico. Desde hace tiempo en el mercado mexicano se encuentran disponibles dos fórmulas de tipo médico, las cuales contiene como fuente principal de proteína la harina de soya.<sup>57</sup>

En Perú existen productos comerciales con aislados de soya, y también existen fórmulas de harina de maíz, frijol, zanahoria, azúcar y aceite vegetal, sin embargo este tipo de formulación no cumple satisfactoriamente en el tratamiento de niños con diarrea causada por desnutrición, además de que el aporte de proteínas no es suficiente y estas no son de buena calidad.<sup>10</sup>

Desafortunadamente el utilizar proteína de soya, tampoco es tan efectivo, ya que, no son tan efectivas en el control rápido de la diarrea, aunando a lo anterior, el efecto de la formación de gases en el intestino, la presencia de cólicos y una tendencia ocasional a incrementar la dermatitis. Por otra parte el uso de harinas de soya en la elaboración de fórmulas infantiles, suministra una gran carga de almidón que no puede ser plenamente utilizado por los lactantes menores de 6 meses, lo cual significa que estos alimentos sólo pueden administrarse eficazmente a lactantes mayores a los 6 meses. Por ello las fórmulas médicas infantiles elaboradas a base de harina de soya se han desechado en otros países, y en su lugar se han diseñado otras cuya fuente de proteína son los concentrados o aislados proteínicos, y que recientemente en México se han introducido al mercado a través de su importación.<sup>57</sup>

Es por ello que la elaboración de la pechuga de pollo deshidratada puede sustituir alguno de estos productos de importación, ya que puede contener alguna de las características de estos concentrados.

Existen otros factores en el éxito de una fórmula infantil como los económicos, culturales y sociales, los cuales determinan la aceptabilidad. El proceso elegido para la elaboración de las fórmulas debe asegurar en el producto final características especiales, tales como mejor digestibilidad, palatabilidad y facilidad en la preparación.<sup>7</sup>

Dado que el contenido energético de los principales componentes de los alimentos suplementarios es relativamente bajo, la densidad energética del producto será baja, resultando en un alimento voluminoso y difícil de manejar, sobre todo en infantes y niños cuya capacidad gástrica es limitada.<sup>7</sup>

Los índices dietéticos expresados en relación a la energía son útiles para evaluar la calidad nutricional de la dieta obtenida, sin embargo estos estudios no consideran la

densidad energética de la dieta tal como se consume, ni el volumen de dieta que los individuos son capaces de ingerir, como se menciono anteriormente.<sup>4</sup>

Hallazgos recientes, dicen que si se requiere aumentar la ingesta energética en niños con capacidad gástrica limitada y con riesgo de desnutrición, es recomendable 60 % por los hidratos de carbono y las grasas oscilantes alrededor de 50 %.<sup>8</sup>

En México se ha tratado de implementar estas dietas para niños desnutridos utilizando como fuente proteínica el pollo, el cual ha dado buenos resultados, al no tener las contraindicaciones que ya se mencionó de la harina de soya, además de que este tipo de proteína si es disponible pero principalmente es de buena calidad (la evaluación de la calidad proteínica se puede evaluar a partir del contenido de aminoácidos, de la digestibilidad o biodisponibilidad.<sup>27</sup>

Estudios con esta proteína y cereales como arroz, garbanzo y maíz, han dado buenos resultados de las pruebas químicas y biológicas. Son muchas las condiciones implícitas en una dieta como fisiológicas y de transformación de los alimentos que afectan la biodisponibilidad, y a en qué medida un nutrimento puede ser absorbido y utilizado.<sup>61</sup>

## **I.C CALIDAD PROTEÍNICA**

La calidad o el valor de una proteína alimentaria es un aspecto importante a considerar en la evaluación dietética y expresa la eficiencia de la utilización de las proteínas por el organismo, o sea la capacidad de construcción o reconstitución de las proteínas corporales, de ahí que no baste solo la cantidad, sino que lo fundamental sea la calidad. Cuanto mejor, sea esta, mayor será la velocidad de crecimiento y la cantidad de nitrógeno de la proteína retenido en el cuerpo.<sup>32</sup>

Si por el contrario la proteína es de baja calidad, la misma será empleada por el organismo para la producción de energía.<sup>24</sup>

La calidad de una proteína viene determinada en primera instancia por su composición en aminoácidos esenciales, los cuales deben encontrarse en cantidades suficientes, en proporciones precisas y de forma simultánea para la realización de la

síntesis proteica. De los 20 aminoácidos suministrados por las proteínas hay 8 que no son sintetizados por el organismo humano, por lo que deben ser procurados mediante la dieta. Estos se denominan aminoácidos esenciales y son la fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, triptofano, treonina, metionina y valina.<sup>24</sup>

Cuando uno o más de los aminoácidos esenciales resulta deficitario, cesa o se retarda mucho la síntesis proteica en los ribosomas, por lo que el resto de los aminoácidos suministrados en cantidades adecuadas son parcialmente utilizados como fuente de energía.

Lo anterior explica por qué las dietas deficientes en uno o varios aminoácidos esenciales no permiten un crecimiento adecuado y pueden conducir a un aumento de la morbilidad, la mortalidad y a trastornos cerebrales con dificultades en el aprendizaje, en épocas tempranas de la vida. Las cantidades requeridas de estos aminoácidos varían con la edad, condición fisiológica y estado de salud.

Otro aspecto a tener en cuenta en el valor de una proteína es la digestibilidad, la cual estima en cierta medida la disponibilidad de los aminoácidos para ser empleados. Es conocido que la digestibilidad de las proteínas animales (90-95%) es superior a las de los vegetales que puede ser bajo como un (60-85 %).<sup>16</sup>

La eficiencia con que se utiliza una proteína para el crecimiento y mantenimiento da la medida de su calidad, existiendo diversos factores que inciden en su utilización.

Dentro de los alimentos existen sustancias que pueden modificar la digestibilidad de las proteínas como son los encontrados en alimentos de origen vegetal los cuales son: factores antitripsicos, compuestos orgánicos como el ácido fítico y altas proporciones de fibra dietética.

Los nutricionistas se interesan principalmente por los inhibidores de proteasas porque su presencia en las leguminosas principalmente, reduce el valor nutritivo de las proteínas. Sin embargo en este caso no son aplicables dichos factores antinutricionales, ya que, como se mencionó la pechuga de pollo tiene únicamente proteína y grasa, descartando los mencionados efectos nocivos que afectan el desarrollo en el ser humano.

La energía suministrada por la dieta es otro factor a tener en cuenta. Cuando la ingestión calórica es inferior a las exigencias establecidos parte de los aminoácidos que

integran el pool metabólico son desaminados y sus restos carbonados convertidos en glucosa por el proceso de gluconeogénesis y oxidados a  $\text{CO}_2$  a través del ciclo de Krebs para la obtención de energía, provocándose una disminución relativa en la velocidad de los procesos anabólicos y como resultado dará una utilización deficiente de las proteínas.<sup>2</sup>

Es necesario destacar que existen relaciones metabólicas entre el consumo de proteínas y carbohidratos dietéticos. Si se ingieren separadamente los carbohidratos y las proteínas se incrementan las pérdidas, con las grasas no se observa un efecto semejante. A esto se le conoce como efecto de economizar proteínas por los carbohidratos.<sup>16</sup>

Otro aspecto a considerar es la cantidad de proteínas que suministra la dieta. Como estas no pueden ser almacenadas en el cuerpo, cuando se ingieren cantidades excesivas se pierde el equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos. Los primeros continúan funcionando a la misma velocidad para satisfacer las necesidades de proteínas corporales mientras que el exceso de aminoácidos provocará un incremento en la velocidad relativa del proceso catabólico para la obtención de energía, la formación de algunos cuerpos cetónicos o la síntesis de carbohidratos y lípidos, forma en que pueden acumularse, manifestándose una pérdida considerable de nitrógeno en la orina.<sup>28</sup>

Si el suministro de proteínas dietéticas se mantiene por debajo de los niveles requeridos pero con un nivel energético adecuado, entonces la actividad catabólica estará aumentada hidrolizándose ciertas proteínas corporales, de menor importancia biológica, consideradas como lábiles para la obtención de aminoácidos libres con los cuales contrarresta, en cierta medida, el suministro deficiente y así garantizar la síntesis de otras proteínas más necesarias, proceso que no conduce a la obtención de energía. La presencia de otros nutrimentos como vitaminas y minerales incide también en la utilización de las proteínas de una dieta. El fosfato de piridoxal ó vitamina B6 juega un papel fundamental en el metabolismo de los aminoácidos, ya que la absorción de los mismos ocurre a nivel intestinal por un mecanismo de transporte activo selectivo dependiente del ion sodio, con la formación de las llamadas bases de Schiff entre los aminoácidos y el fosfato de piridoxal.<sup>2</sup> Las enzimas que llevan a cabo los procesos de descarboxilación y transaminación de los aminoácidos utilizan como coenzima el fosfato de piridoxal.<sup>29</sup>

Otras vitaminas como el ácido fólico, la cianocobalamina o B12 y la vitamina C participan en algunos casos específicos del metabolismo de aminoácidos o de forma indirecta a través de la biosíntesis de ácidos nucleicos.<sup>16</sup>

El uso del calor y agentes químicos en el procesamiento de alimentos puede afectar la disponibilidad proteica.<sup>16</sup>

Los tratamientos térmicos pueden tener como consecuencia, dependiendo de la intensidad, modificaciones de ciertos aminoácidos por la vía de la isomerización, desulfuración y desaminación, que en ocasiones traen como consecuencia la formación de sustancias tóxicas.<sup>21</sup>

No obstante en 1977 plantearon que la cocción casera, en horno o por fritura no tiene una incidencia acusada sobre las proteínas siempre que se realice a temperaturas bajas, mientras la cocción en agua o en vapor, motiva pérdidas aminoácidas por disolución y difusión. <sup>14</sup>De forma general la cocción mejora la digestibilidad de las proteínas por la desnaturalización que ellas sufren. Sin embargo, tratamientos más enérgicos son responsables de un descenso de la digestibilidad de proteínas y de la disponibilidad de aminoácidos debido a la formación de enlaces ínter o intramoleculares que no son atacados por las enzimas digestivas.

Tanto durante los tratamientos tecnológicos, como en el almacenamiento de los alimentos que contienen proteínas y carbohidratos reductores, o compuestos carbonilos (como los aldehídos y cetonas derivados de la oxidación de lípidos), se produce el pardeamiento no enzimático del tipo reacción de Maillard. Uno de los aminoácidos que más se afecta en este tipo de reacción es la lisina, por lo que se hace necesario la determinación de la misma.

Son numerosos los procesos tecnológicos en los que participan agentes que pueden modificar los restos de aminoácidos de la proteína, siendo los más sensibles los tioaminoácidos, el triptofano, y en menor cuantía la tirosina y la histidina.

No obstante el calentamiento también puede tener efectos favorables, en los huevos cocidos, por ejemplo, se destruye el inhibidor ovomucoide de la tripsina, y en el caso de la harina de soya mejora la disponibilidad de la metionina y de igual modo ocurre la destrucción de factores antinutricionales.<sup>16</sup>

Puesto que cada proteína tiene un determinado valor nutricional, resulta útil su estimación para decidir la cantidad que se requiere con vistas a satisfacer las necesidades de aminoácidos durante el crecimiento, además de poder detectar los cambios nutritivos que pueden sufrir durante el procesado y el almacenamiento de los alimentos.

Para efectuar esta valoración existen diversos métodos los cuales deben cumplir según la FAO (1991), algunas consideraciones generales como son: <sup>17</sup>

- ⇒ Suministrar resultados comparables a los obtenidos mediante estudios clínicos ideados para este fin.
- ⇒ Si existe diferencia entre el método propuesto y los estudios clínicos realizados debe tener una desviación que corresponda al margen de seguridad establecido.
- ⇒ Deben ser aplicables a un amplio rango de alimentos usados en dietas humanas.
- ⇒ Deben demostrar excelente repetibilidad en su realización.
- ⇒ Deben permitir que el ensayo se lleve a efecto en el producto determinado.

Estos métodos se basan en diferentes criterios, ellos son: los biológicos, los químicos, los microbiológicos y los clínicos, siendo imprescindible en la práctica la combinación de varios de ellos para obtener criterios aceptables sobre la calidad de una proteína.

### **I.C.1 Métodos químicos para la evaluación de calidad proteínica**

Los métodos químicos no ofrecen información sobre la forma en que los aminoácidos son aprovechados por el organismo. Estos son utilizados como criterios iniciales por ser los más rápidos. Son fáciles y brindan información sobre las características químicas de las proteínas. Se fundamentan en el análisis de la composición de aminoácidos esenciales y en las reproducciones in vitro de la digestibilidad de las fuentes proteicas.

La cuenta química, la digestibilidad in vitro y los aminoácidos disponibles son los índices químicos más comúnmente empleados para estos fines.

#### **I.C.1.1 Cuenta química (CQ).**

Dentro de los métodos químicos el más utilizado es el cómputo químico, cuyo fundamento teórico fue descrito inicialmente por Block y Mitchel en 1946, quienes



demonstraron que hay una relación cuantitativa entre la composición de aminoácidos de las proteínas y su valor biológico en ratas.

Para que ocurra la síntesis a nivel celular es imprescindible la presencia de todos los aminoácidos esenciales en proporciones adecuadas. Un déficit en cualquier aminoácido esencial limitaría la síntesis proteica en la misma proporción en que este aminoácido este deficitario en comparación con las cantidades requeridas.

Es necesario conocer la cantidad de aminoácidos esenciales en la proteína para la determinación del cómputo químico. Con este propósito es sometida a distintos procesos hidrolíticos y a continuación se determinan las cantidades de aminoácidos que la forman, utilizando analizadores automáticos u otras técnicas cromatográficas tal como la cromatografía gaseosa y la cromatografía líquida de alta resolución.<sup>1</sup>

También se puede hacer el cálculo teórico mediante el uso de tablas de composición y programas de computación.

Los valores se expresan individualmente por comparación con el contenido del mismo aminoácido esencial en una proteína de referencia, tomándose como valor de cómputo químico el mas bajo que corresponde con el valor del aminoácido que limita el aprovechamiento de la proteína y que se denomina aminoácido limitante.

Varias proteínas han sido analizadas para ser tomadas como patrones de referencia, primero fue la del huevo la que se tomó como estándar (Block y Mitchell, 1946). Este proceso fue adoptado por la FAO en 1957 y con cierta modificación posterior en 1965 por la misma organización. El empleo de estos factores trajo como consecuencia que los valores de cómputo químico para algunas proteínas alimentarias fuera relativamente bajos debido a las cantidades elevadas de aminoácidos esenciales presentes en las proteínas del huevo.<sup>17</sup>

En 1973 la FAO <sup>18</sup> propuso un patrón único de referencia basado en las necesidades de aminoácidos esenciales de los niños de corta edad que reemplazó como estándar a la proteína de huevo entero. Esto se realizó a pesar de conocerse que los requerimientos de aminoácidos dependen del grupo poblacional, pues los niños de edad escolar necesitan aproximadamente el 30% de su proteína en forma de aminoácidos esenciales, mientras los adultos aparentemente necesitan solo un 15% o menos.<sup>17</sup>

Claramente, la adopción del patrón infantil subestima el valor de la proteína para satisfacer los requerimientos de los adultos. Era la opinión que al ser este patrón más exigente debía ser empleado para todas las edades dando esto en la práctica un margen de seguridad en la estimación de la calidad proteica de alimentos y dietas.<sup>17</sup>

Fue en 1985 que la FAO/OMS/ONU <sup>19</sup> informa diferentes patrones en dependencia de grupos de edad, basados en las exigencias de aminoácidos esenciales expresados en mg por Kg. de peso corporal por día. Estos valores fueron entonces divididos por el nivel recomendado de proteína ingerida (gramos de proteínas por Kg. de peso corporal por día) y así calcular el patrón (mg por gramo de proteína).

En 1989, sobre la base de nuevas evidencias, la FAO y la OMS publicaron un patrón revisado de puntuación de los aminoácidos esenciales para rectificar el patrón de 1985. El mismo recomienda que la composición de aminoácidos de la leche humana debe continuar siendo la base del patrón para evaluar la calidad proteica en alimentos para niños menores de un año, pero que el propuesto en 1985 por la FAO/OMS/ONU para niños de edad preescolar debe ser utilizado para todos los grupos de edades por encima de la infancia. Debido a esto los requerimientos de lisina y triptofano son superiores y ligeramente inferior para la leucina.

Luego el valor de cómputo químico dependerá del patrón que se escoja para sus comparaciones, si se toma un valor de requerimientos bajos (adultos) se podrían obtener valores de cómputo superiores a 100 para una proteína, mientras que si se toman los valores de los patrones de niños, se podría subvalorar el valor biológico de ella. Para tener una idea más aceptada debe calcularse el cómputo químico haciendo uso del patrón de niños, adultos y puntajes señalados por la FAO.

Este método permite calcular el cómputo respecto a una sola proteína o una mezcla de ellas. En este último caso, si se conoce la puntuación química (para todos los aminoácidos esenciales) de las proteínas constituyentes de la dieta y solo varían las proporciones, es posible calcular el cómputo mediante un procedimiento de la media ponderada; pudiéndose calcular el valor de complementación de las diferentes proteínas.<sup>17</sup>

Aún cuando debe realizarse el cálculo para todos los aminoácidos esenciales, en la práctica se ha observado que es suficiente realizarlos para la lisina, los aminoácidos

azufrados y el triptofano, por ser estos los que más frecuentemente aparecen como limitantes.<sup>43</sup>

De igual forma no se recomienda informar el cómputo químico solo para el primer aminoácido limitante, sino que debe calcularse para el segundo y tercer limitante con el fin de obtener un criterio más integral de la proteína que se evalúa.<sup>17</sup>

El inconveniente principal que se presenta con el cómputo químico es la utilización de la composición aminoacídica de una proteína ideal que contenga todos los aminoácidos esenciales en cantidades suficientes para atender las necesidades sin ningún exceso.

Otro inconveniente es el hecho de que un análisis preciso del triptofano y los tioaminoácidos y, en su caso, las proporciones de aminoácidos isoméricos, requiere el uso de técnicas especiales. No tiene en cuenta, además, los efectos negativos de los aminoácidos presentes en exceso. Tampoco compensaciones para las diferencias en la digestibilidad de las proteínas o en la biodisponibilidad de aminoácidos específicos. En proteínas de muy baja calidad este método ha sido muy criticado por las discrepancias constatadas entre los cómputos y las estimaciones realizadas empleando métodos biológicos.

Se ha comprobado que la correlación entre los resultados de los bioensayos y de las determinaciones químicas mejora cuando se corrigen estas últimas teniendo en cuenta la digestibilidad de las proteínas, la misma se calcula multiplicando la mas baja de las relaciones de aminoácidos por la digestibilidad real de la proteína. Esto es válido para el análisis de mezclas de alimentos, si se conocen con exactitud la digestibilidad y composición aminoacídica.<sup>17</sup>

### **I.C.1.2 Digestibilidad in vitro (DIV).**

La digestión enzimática in vitro es aquella que trata de reproducir el comportamiento de las proteínas bajo la acción de las enzimas que posee el sistema digestivo de los animales de experimentación. Dado el número de enzimas utilizadas, el tiempo de experimentación y los productos finales que se evalúan, surgen numerosas modificaciones de estos métodos, por ejemplo se ha descrito el empleo de un sistema pepsina-pancreatina y papaína-tripsina.

En ellos se deben tomar precauciones ya que las técnicas a menudo involucran tratamientos a la muestra que no son exactamente aplicables a la dieta original, como por ejemplo una fina trituración.

### **I.C.1.3 Disponibilidad de aminoácidos (DA).**

No siempre concuerda el contenido de aminoácidos esenciales de una proteína con su disponibilidad verdadera, pues existen algunos aminoácidos que sufren modificaciones estructurales durante los procesos a que es sometida la proteína, que limitan su aprovechamiento o alteran su disponibilidad. En la práctica a los aminoácidos que se les determina su disponibilidad son al triptofano, a la metionina y a la lisina, este último es el que más se ha desarrollado y es de gran utilidad en la evaluación de la calidad proteica.<sup>16</sup>

### **I.C.1.4 Método de lisina disponible.**

La lisina actúa como una base fuerte al presentar un grupo amino libre. Se encuentra en proporciones de 7 a 9% en el huevo, leche y carne. En vegetales y cereales su contenido es mas bajo, mientras que en el germen de trigo y en la soya están en proporciones superiores.<sup>59</sup>

Para poder ser utilizada por el organismo la lisina requiere que su grupo amino esté libre, pues cuando el mismo está comprometido su disponibilidad disminuye.

Las reacciones del grupo amino pueden producirse en presencia de carbohidratos, durante el tratamiento térmico o con álcali, teniendo en cuenta las afectaciones que puede sufrir este aminoácido y que el mismo es limitante común a muchas proteínas se plantea la importancia de la cuantificación de lisina disponible como índice de calidad proteica. El método más empleado se basa en la reacción de Sanger y fue propuesto por Carpenter en 1973. En esta técnica se hace reaccionar la proteína con flúordinitrobenceno (FDNB) obteniéndose derivados dinitrofenilados que se cuantifican espectrofotométricamente.<sup>12</sup>

Al comentar los métodos de determinación de lisina Pellet (1980) plantea la utilización de colorante azo por su rapidez y bajo costo. También informa un método para determinar el contenido de lisina en hidrolizados ácidos, haciendo uso de la enzima lisina-

descarboxilasa la cual es específica solo para L-lisina que presenta libre el grupo e amino. Por lo tanto puede usarse para evaluar la disponibilidad biológica de este aminoácido.<sup>43</sup>

#### **I.C.1.5 Determinación de triptofano.**

El triptofano es un aminoácido esencial que se encuentra en pequeñas cantidades en los alimentos proteicos. Su contenido oscila entre 1-1.5% en la carne, la leche, el huevo y el pescado, en cereales se encuentran en menores proporciones del 0.7-1.3%.<sup>59</sup>

Presenta un grupo indólico en su estructura, una vez que este es separado puede determinarse espectrofotométricamente manifestando un máximo de absorbanza a 280 nm.

Por ser uno de los que más se daña en procesos tecnológicos ácidos y ser limitante en las proteínas de la mayoría de los cereales, se tratará por separado, aunque la determinación del mismo esté incluida dentro del cómputo químico. En muchos casos para la determinación cuantitativa de este aminoácido se realiza una hidrólisis básica o enzimática de la proteína y una vez concluida la misma, el triptofano puede ser determinado tanto cromatográfica como colorimétricamente.

#### **I.C.2 Métodos biológicos.**

Los métodos biológicos son uno de los más utilizados para evaluar la calidad de una proteína, ellos suministran información sobre la forma en que las proteínas dietéticas son utilizadas por el organismo.

Para llevar a cabo estos métodos es necesario tener en cuenta toda una serie de condiciones experimentales con el objetivo de garantizar la mayor exactitud y precisión en los resultados, como son: animales de experimentación (se prefieren ratas machos recién destetados), tener la misma edad, proceder de la misma camada y colocarse en jaulas metabólicas que permitan la cuantificación de los alimentos ingeridos, así como la separación y recolección de las heces y la orina. A estos animales se les suministra una dieta que contenga todos los nutrimentos en cantidades requeridas, estas deben ser isocalóricas de manera que la única variable sea la proteína. Conjuntamente se debe trabajar con un grupo de animales que reciba una dieta libre de nitrógeno y otro grupo

que reciba una proteína de referencia (generalmente se utiliza la caseína o la proteína del huevo)

Adicionalmente se debe controlar la temperatura, ruidos, humedad y los tiempos de luz y oscuridad. Para el estudio de los métodos biológicos, estos se han dividido en tres subgrupos fundamentales: los basados en el cambio de peso corporal, los que se fundamentan en el balance de nitrógeno y los que se agrupan en el uso de distintos niveles de proteínas.

### **I.C.2.1 Métodos basados en la variación del peso corporal.**

Teniendo en cuenta que el crecimiento es un indicador de la utilización de las proteínas por el organismo, se han descrito tres índices fundamentales que relacionan la ganancia en peso corporal con la cantidad de proteína consumida, ellos son la razón de eficiencia proteica, la razón de proteína neta<sup>9</sup> y eficiencia de retención de proteínas.<sup>32</sup>

#### **I.C.2.1.1 Razón de eficiencia proteínica (REP).**

Es una relación en la que se determina la variación en peso de los animales por gramo de proteína consumida. Generalmente se utiliza un período de experimentación que oscila entre los 21 y 28 días en los cuales se le suministra de forma libre una dieta que contiene entre un 9 y 10% de la proteína en estudio, nivel que se ha considerado como óptimo para mantener un equilibrio dinámico entre el anabolismo y el catabolismo de aminoácidos. El peso corporal se registra al inicio de la evaluación y durante la misma una vez cada 7-10 días.

La REP tiene varios inconvenientes, en la práctica solo se obtienen valores dentro de un intervalo de 0 ó 3, de manera que resulta muy difícil concluir sobre la calidad de una proteína dada. Es por esta razón, que durante el experimento se utiliza un grupo control que recibe una proteína de referencia (huevo ó caseína) y los valores de REP se representan como valores relativos.

Otra desventaja en la determinación de la REP es que no se tiene en cuenta la cantidad de proteínas utilizadas para el mantenimiento y recambio de las proteínas corporales y asume que toda la proteína ingerida se utiliza para el crecimiento. En este

sentido además, se ha podido establecer que en la rata la ganancia en peso corporal se correlaciona bastante bien con la acumulación de proteínas en los nuevos tejidos, pero esto no sucede en otras especies; además el método no puede ser utilizado en proteínas de baja calidad porque daría un valor negativo al haber una pérdida de peso en el animal. A pesar de estos inconvenientes la REP es muy utilizada por tener como ventaja su fácil realización.<sup>55</sup>

### **I.C.2.1.2 Razón de proteína neta (RPN).**

Con el objetivo de considerar la proteína que se requiere para el mantenimiento, limitante fundamental de la ERP, el método para la determinación de la RPN utiliza un grupo adicional de animales a los que se les suministra una dieta libre de nitrógeno, donde la proteína ha sido sustituida generalmente por una combinación de almidón y sacarosa.<sup>9</sup>

A este grupo que recibe la dieta libre de nitrógeno se le mide la pérdida de peso corporal durante el período experimental.

De igual forma que el REP, la RPN puede ser informada en términos de RPN (relativo) cuando se compara con una proteína de calidad reconocida.

Aunque este método si tiene en consideración la proteína utilizada en el mantenimiento, considera la pérdida de peso en dietas libres de nitrógeno como una medida de la cantidad de proteína requerida para el mantenimiento y este es el error fundamental de este método pues los reajustes fisiológicos que ocurren cuando las proteínas en la dieta se sustituyen por elementos energéticos provocan una modificación en el metabolismo de las fuentes endógenas de proteínas que no pueden ser detectadas por una simple pérdida de peso corporal.

### **I.C.2.1.3 Eficiencia de retención de proteína (ERP).**

La medida de la RPN se efectúa similarmente a la de la ERP. Se estima la cantidad de peso corporal que tiene que ser repuesto antes de que la proteína problema sea usada para el crecimiento, alimentando a un grupo de ratas con una dieta exenta de proteína y midiendo la pérdida de peso. Si se supone que el 16% de la ganancia de peso corporal de la rata es proteína, entonces multiplicando el valor (cambio de peso problema + pérdida

de peso sin proteína) por 0.16 se obtiene una estimación de la proteína ingerida que queda retenida. Este valor se denomina Eficiencia de retención de proteínas ERP. Su valor máximo es de 1, puesto que una proteína ideal sería aquella totalmente retenida.<sup>32</sup>

### **I.C.2.2 Métodos basados en el balance de nitrógeno.**

Los métodos basados en el balance de nitrógeno ofrecen una medida de como el organismo puede aprovechar las proteínas que ingiere, atendiendo al comportamiento del nitrógeno que desecha en comparación con el nitrógeno ingerido.

Estos métodos además de considerar las proteínas empleadas en el mantenimiento brindan información sobre la digestibilidad y utilización de estos compuestos. Los requisitos de experimentación son similares a los basados en el crecimiento pudiendo ambos ser desarrollados de manera conjunta.

#### **I.C.2.2.1 Digestibilidad aparente y verdadera (DA y DV).**

El término de digestibilidad aparente considera que todo el nitrógeno excretado en las heces es proveniente de la dieta. En 1924 se revisó la metodología propuesta y demostró como el nitrógeno fecal está integrado por sustancias nitrogenadas de origen dietético y de origen endógeno no absorbidas por lo que es preciso realizar una corrección del nitrógeno fecal que permita eliminar el aporte de nitrógeno endógeno, para garantizar que su valor sea únicamente representativo de las sustancias nitrogenadas que suministradas por la dieta no han sido incorporadas al torrente circulatorio en el proceso de absorción intestinal.<sup>31</sup>

Para realizar esa corrección se introdujo un grupo experimental al cual se le suministró una dieta libre de proteínas y se le denominó nitrógeno fecal de origen endógeno al nitrógeno determinado en las heces de este grupo de animales. A este nuevo valor de digestibilidad, le denominó, digestibilidad verdadera, siendo esta metodología la que propuso el comité de expertos de la FAO<sup>17</sup> para determinar la digestibilidad de las proteínas en el hombre, al plantear la similar capacidad del hombre y de la rata para digerir los alimentos.



#### **I.C.2.2.2 Valor biológico.**

El valor biológico de una proteína dietética fue definido por Thomas (1919) y Mitchel (1924). Se expresa como la relación entre el nitrógeno retenido y el nitrógeno absorbido en el cuerpo para el mantenimiento y el crecimiento. Se realiza por tanto la determinación del nitrógeno eliminado en las heces y la orina, corrigiéndose los valores mediante la determinación de los mismos en animales con una dieta libre de nitrógeno.

Este método es ampliamente utilizado a pesar de presentar algunas desventajas, como son: extrapola datos de animales diferentes y considera constante el nitrógeno urinario y fecal en los animales con dieta libre de nitrógeno.<sup>31</sup>

#### **I.C.2.2.3 Utilización neta de la proteína (UNP).**

En este método se mide la cantidad de nitrógeno retenido. Este índice es muy completo pues el nitrógeno retenido o incorporado al organismo es la mejor medida de la calidad proteica. También nos da información sobre la digestibilidad y el valor biológico de la proteína.

Para la determinación del nitrógeno retenido existen dos métodos generales, uno que se basa en los estudios de balance de nitrógeno <sup>31</sup> y otro en las determinaciones de nitrógeno corporal.

En el método basado en el cálculo del nitrógeno retenido utilizando las técnicas de balance se utiliza la misma metodología empleada en el valor biológico. El valor obtenido de UNP se denomina UNP calculado pues resulta equivalente a multiplicar el valor biológico por la digestibilidad. En el método basado en la determinación del nitrógeno en todo el cuerpo del animal que recibe la proteína experimental, el valor del nitrógeno corporal en un grupo de animales que reciben una dieta libre de proteínas y a este valor se le denomina UNP determinado.

Considerar que la cantidad de nitrógeno endógeno en las heces y orina es la misma para el grupo que no recibe la proteína, es el error teórico fundamental imputable a estos métodos (digestibilidad, VB y UNP) por cuanto los reajustes metabólicos en ambos casos difieren considerablemente.

La utilización de una dieta que contenga 4% de proteína liofilizada de huevo entero parece ser el método más adecuado para la determinación del nitrógeno endógeno urinario y fecal.<sup>15</sup>

#### **I.C.2.2.4 Utilización de la proteína por el hígado (UPH).**

Este método se basa en la susceptibilidad de los órganos a la calidad proteica, en este sentido se plantea que el hígado es un órgano muy sensible a los cambios de calidad de la proteína dietética y es uno de los primeros en reflejar dicha calidad. El animal es sacrificado para determinar el nitrógeno hepático haciéndolo un método engorroso. Tiene como deficiencia que extrapola datos de diferentes animales y como ventaja que da valores representativos de la calidad proteica, lo que lo hace un buen sustituto de la UNP.<sup>53</sup>

#### **I.C.3 Métodos que utilizan distintos niveles proteínicos.**

Los métodos que utilizan distintos niveles proteicos en la dieta miden tanto la variación en peso corporal de los animales de experimentación como el comportamiento del balance nitrogenado, según la cantidad de proteína ingerida.

Dentro de estos índices tenemos: valor proteico <sup>49</sup> e índice de crecimiento por nitrógeno (ICN).<sup>26</sup>

Además de estos grandes grupos existen otros métodos biológicos que no consideran el crecimiento, ni el balance de nitrógeno para la evaluación de la calidad proteínica, estos métodos se conocen como indirectos y hasta el momento no han sido adaptados de manera general como los anteriores.

En sentido general los métodos biológicos tienen una gran importancia ya que como se realizan en animales de experimentación nos da la posibilidad de conocer la respuesta del animal frente a la proteína en estudio, su aceptación por el animal (palatabilidad) nos brinda información sobre su toxicidad, además mediante los métodos biológicos de balance se obtiene una buena correlación entre sus valores y la calidad proteica.

No obstante aunque los métodos biológicos son muy utilizados existen limitaciones en cuanto a la cantidad y tipo de información que se deriva de los procedimientos de ensayo con animales. Entre las principales desventajas de estos métodos se pueden citar: que no suministran información acerca de los aminoácidos esenciales y generalmente los resultados se extrapolan de los animales al hombre.

## **I.D CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS DE LOS POLVOS**

Cuando se producen leches en polvo para uso comercial es necesario cumplir con ciertas normas, tanto bacteriológicas, químicas como físicas. Es necesario por lo tanto, para una producción rentable analizar los productos en polvo y averiguar si cumplen con los requerimientos, y en caso contrario, para poder variar los parámetros de secado a fin de cambiar aquella propiedad que no cumple con las normas. Las propiedades físicas y químicas de las leches en polvo tienen especial importancia en relación con su envasado, almacenamiento y utilización.<sup>33</sup>

### **I.D.1 Propiedades físicas.**

El comportamiento físico de materiales en polvo está determinado por la magnitud del parámetro de cohesión entre las partículas. La densidad y la compresibilidad son propiedades físicas que pueden ser correlacionadas con la cohesión. La información cuantitativa de tales propiedades encuentra utilidad práctica como control del comportamiento de materiales en polvo durante su almacenamiento o procesamiento bajo diferentes condiciones o como criterio de calidad de las materias primas, producto semielaborado y/o terminado.<sup>23</sup>

#### **I.D.1.1 Humedad.**

El contenido de humedad tendrá una influencia en la conservación de la calidad del polvo. Un alto contenido de humedad decrementará la calidad de las proteínas por

diversos factores como son las reacciones de Millard que se puedan dar (no común en pechuga de pollo deshidratada), la oportunidad de los microorganismos de poder desarrollarse y aprovechar estos nutrimentos, reacciones como liberación de compuestos nitrogenados, etc.

El material de empaque debe tener un coeficiente de difusión bajo al vapor e agua y oxígeno. Como siempre hay alguna difusión de vapor, se recomienda almacenar el polvo en un lugar frío y seco donde la presión de vapor de agua sea baja, además de proteger los polvos con un antiaglomerante como el  $\text{SO}_2$ , que ejerce un efecto protector sobre la proteína de pollo obtenida y mejora sus propiedades reológicas.<sup>23,58</sup>

### **I.D.1.2 Densidad.**

La densidad de un polvo constituye una medida comercial importante. Al transportar el polvo largas distancias, es muy importante para los fabricantes obtener una alta densidad para reducir el volumen transportado. Una alta densidad ahorra también material de envase y se reduce a la capacidad de almacenaje.

La densidad de un polvo se define como el peso de un volumen dado de polvo y se expresa en g/ml, g/100 ml o g/l. El valor recíproco es el volumen global que se expresa en ml/100g o ml/g. El volumen global es aplicable cuando se emplea un vaso cilíndrico para la determinación.<sup>23</sup>

Dentro de los factores que influyen en la densidad se encuentran los siguientes:<sup>23</sup>

1. Densidad de las partículas, dada por:
  - a. contenido de aire ocluido en las partículas
2. Cantidad de aire intersticial, es decir aire entre las partículas.
3. Fluidez

### **I.D.2 Pruebas de reconstitución de polvos**

Las principales prueba que se realizan para conocer la reconstitución de los polvos son las siguientes: humectabilidad, solubilidad y volumen de sedimentación.<sup>23</sup>

### **I.D.2.1 Solubilidad**

La determinación del valor de la solubilidad de los polvos es empírica, dependiendo de factores como el método de deshidratación, la temperatura de secado, la acidez y el método de realizar la prueba. Los resultados tienden a ser comparativos. La mayor parte de los polvos secados por aspersión son casi 100% solubles mientras que la solubilidad de los polvos secados en cilindro es usualmente es del 80-95%.<sup>25</sup>

### **I.D.2.2 Volumen de sedimentación**

Entre las principales pruebas que se realizan para conocer la reconstitución de un polvo se encuentra el volumen de sedimentación. Por razones termodinámicas, una vez iniciado el proceso de dispersión se desarrolla simultáneamente una tendencia del sistema volver a un estado energéticamente más estable, manifestado por fenómenos de sedimentación, floculación y coalescencia.

El volumen de sedimentación (F) es la relación entre el volumen de equilibrio (Vu) y el volumen total de la suspensión (Vo).

$$F = Vu / Vo$$

Cuando aumenta el volumen de sedimentación que aparece ocupado por el sedimento, también aumenta el valor F; que normalmente es de 0-1.

Es evidente que en una suspensión determinada sí es posible hacer que F se acerque más a la unidad del producto se hace más aceptable, porque el volumen del sobrenadante se reduce progresivamente. Cuando F=1 no hay sedimento visible aunque el sistema está floculado.<sup>47</sup>

### **I.D.3. Pruebas reológicas**

Dentro de las principales pruebas reológicas que se pueden mencionar en los polvos las más importantes son el ángulo de reposo y la velocidad de flujo, ya que

dichos parámetros indican que tipo de diseño se debe emplear en transportación, manejo de los polvos, tipo de almacenamiento y embalaje final.<sup>23</sup>

### **I.D.3.1      Angulo de reposo**

El ángulo de reposo es una medida relativa de la fricción de las partículas de polvo y es una medida que forma la superficie lateral del cono con la horizontal. El ángulo de reposo es pequeño cuando se trata de partículas finas, angulares o pegajosas; los valores óptimos para obtener un polvo de buena calidad están entre 30 y 40 grados.<sup>47</sup>

### **I.D.3.2      Velocidad de flujo**

La velocidad de flujo permite saber que tan fácil fluye en polvo, considerándose el tiempo que tarda en pasar una cierta cantidad de polvo a través de un embudo de flujo.<sup>47</sup>

## **II.- METODOLOGIA**

### **II.A DESARROLLO EXPERIMENTAL**

#### **II.A.1 Listado de componentes y elección**

Al ser la pechuga de pollo, la fuente para producir el deshidratado con alto contenido proteínico y bajo contenido en grasa, esta tiene que cumplir con ciertos parámetros como la calidad de la carne, es decir su frescura, las condiciones de almacenamiento, el precio y la disponibilidad. Dichos parámetros eran posibles al adquirir la pechuga de pollo en un supermercado, y para mantenerlos constantes, se decidió comprar de la cadena avícola "bachoco".

#### **II. A.2 Obtención de ingredientes y desarrollo de diagramas de secado.**

En base a los criterios antes mencionado se procedió a comprar el pollo en un supermercado cerca de la localidad de estudio, tratándose de mantener la temperatura de refrigeración.

Se elaboró una representación esquemática de los diferentes tipos de secado que se habrían de aplicar a la pechuga de pollo, en donde se eligieron tres tipos de secado con dos tratamientos de la pechuga de pollo.

#### **II. A.3 Proceso de elaboración.**

El proceso de elaboración de la pechuga de pollo deshidratada consiste en separar en tres porciones un lote de pechuga limpia, cada tercio del lote original va a recibir un tratamiento. (Ver diagrama II.A).

Para obtener buenos resultados y reducir el riesgo de contaminación microbiológica cruzada, es necesario que durante la etapa de obtención y almacenamiento se mantengan las condiciones higiénicas adecuadas, como son: limpieza del equipo, limpieza en las áreas de trabajo, evitar corrientes de aire y personal no autorizado cerca del área de trabajo, tener higiene personal usando batas limpias,

cofia y cubrebocas así como tener cerca un sistema de lavado para recurrir a el cuando sea necesario.

a) Recepción de materias primas

Una vez adquirida la pechuga de pollo del supermercado, se procedió a una inspección física de ésta, revisando si no presentaba colores y olores ajenos o extraños, una vez revisado se procede a lavar las pechugas con agua corriente, quitando previamente la piel y huesos.

b) Pesado de Materiales

Se realizó el pesado en una balanza electrónica con una sensibilidad de 0.1 g en vasos de precipitados previamente pesados y limpios. Aquí se divide el lote en tres partes iguales para posteriormente darle un tratamiento diferente a cada uno de estos 3 sublotes

c) Pre-tratamiento antes del secado

De los 3 sublotes antes seleccionados uno de ellos se corta en trozos pequeños en pequeñas partes con un cuchillo limpio en una tabla desinfectada con cloro, una vez obtenidos los trozos se colocan en una charola de aluminio.

Los dos sublotes restantes se cuecen en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 ° C con 15 libras de presión, una vez cocidos se colocan en una licuadora industrial y se mezclan con la propia agua de cocimiento añadiendo 500 ml por cada Kg. de pechuga cocida, se licúan durante 10 minutos hasta obtener una pasta de pechuga de pollo. Aquí uno de los dos lotes se pone en una charola de aluminio y la otra se ajusta a un 13 % de sólidos totales con agua, tomando en cuenta el agua agregada. Esta última muestra es la que se va a secar por el aspersor, por lo que si no se va a secar en el momento después de su cocción se tiene que refrigerar en un periodo máximo de 24 h.



#### d) Secado de las muestras

De las tres muestras anteriores la primera que no tiene la pechuga de pollo un tratamiento térmico y que solo es cortada en trozos se somete a un secado constante durante 18 h a 55 ° C, en una estufa de aire forzado a este lote se le va a dar la denominación de pollo crudo (PC). Esta muestra seca tiene un tratamiento posterior

De la segunda muestra que está cocida y que se obtiene una pasta se somete al mismo tratamiento que el pollo crudo de la muestra anterior. A este pollo se le va a dar la denominación de pollo cocido y seco en estufa (PE). Esta muestra seca tiene un tratamiento posterior

De la tercera muestra se ajusta a un 13 % de sólidos se somete al secado por atomización. En este proceso es necesario estabilizar el equipo de secado por aspersion con agua a una temperatura de entrada constante, en donde este simulándose la entrada del producto a secar, es decir, el agua introducida va a servir para crear un equilibrio en lo que se refiere a temperaturas de entrada y temperaturas de salida, al igual que la muestra, las condiciones operacionales del equipo son de 200 ° C de la temperatura de aire de entrada y que éste salga a una temperatura aproximada de 100 ° C con una presión de 4.0 Bares dentro de la cámara. Una vez establecidos los parámetros operacionales se alimenta la muestra saliendo ésta ya seca con una humedad no mayor al 2 %. Esta muestra se envasa y se le realizan las pruebas posteriores. A esta muestra se le ha denominado como PS.

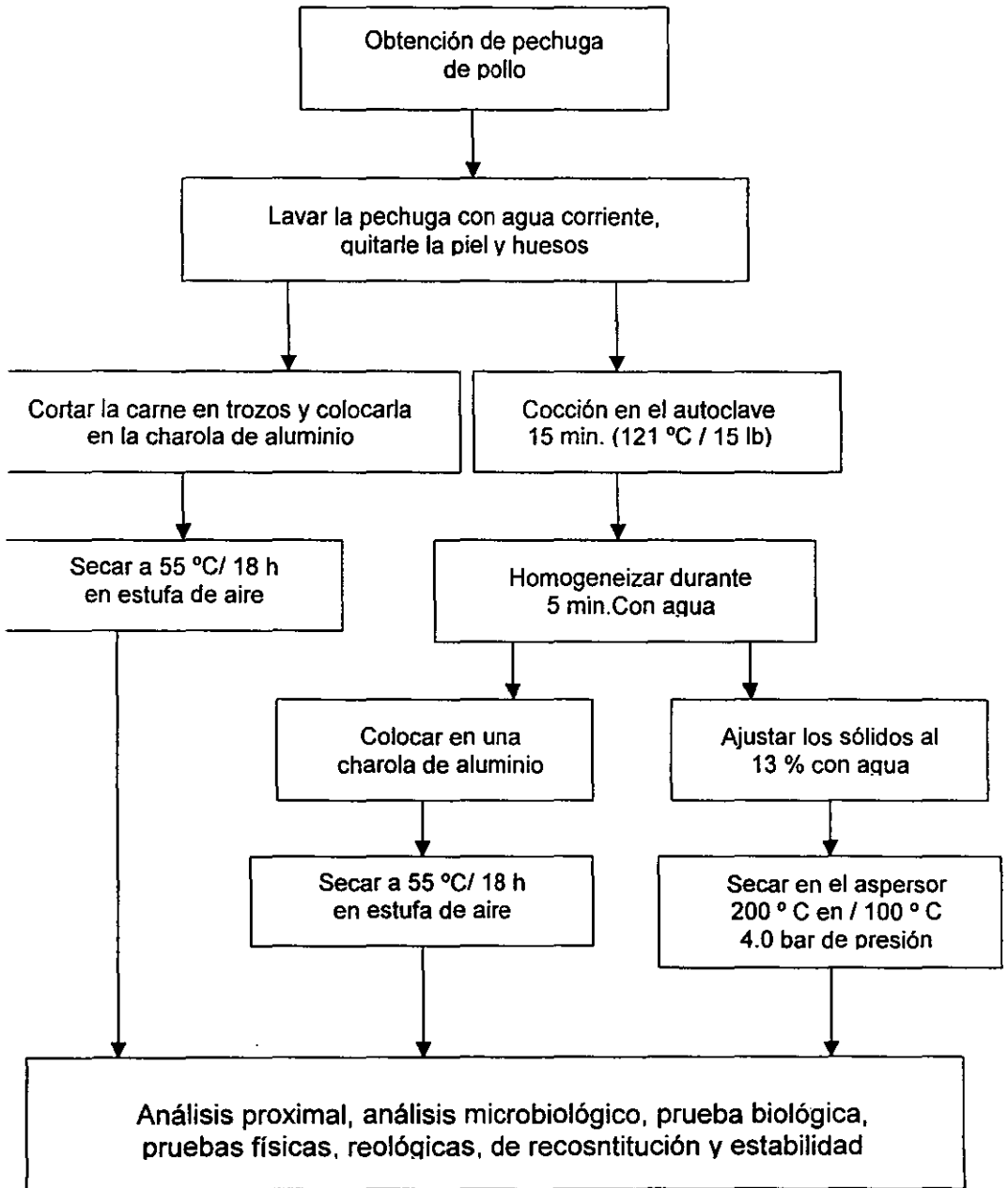
#### e) Tratamientos post-térmicos

Las muestras denominadas PC y PE, ya secas tienen un tratamiento de molienda; estas muestras son pasadas a través de un molino de martillos con una malla del número 100, para de esta forma, obtener un polvo uniforme de fácil manejo y transporte.

#### f) Análisis de las muestras

Después de realizar las operaciones antes mencionadas se procede al análisis de las muestras. El primer análisis que se les realiza es el análisis proximal (humedad, cenizas, grasa cruda y proteína las demás determinaciones no se realizaron por que de antemano se sabe que la pechuga de pollo no tiene fibra ni carbohidratos), análisis microbiológico (mesófilos aeróbicos, coliformes, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, hongos y levaduras), aminograma, pruebas biológicas (razón de eficiencia proteica y digestibilidad), análisis físico(densidad aparente), pruebas de reconstitución (volumen de sedimentación y solubilidad), pruebas reológicas (ángulo de reposo y velocidad de flujo) y pruebas de estabilidad (estabilidad al calor), las técnicas de cada una de las determinaciones se mencionaran en el siguiente capítulos.

**Figura II.A. Diagrama del Desarrollo Experimental**



## **II. B ANÁLISIS PROXIMAL**

Se determinó la composición química de los tres tipos de polvos que se obtuvieron (PC, PE y PS), de acuerdo a los métodos citados en el A.O.A.C., exceptuando la determinación de grasa cruda, en la que se realizó una modificación del método.

Los análisis realizados se observan en el Anexo I y son los siguientes:

- Humedad
- Cenizas
- Proteína Cruda
- Grasa cruda (extracto etéreo) con pre - tratamiento de la muestra con alcalí y etanol

La determinación de carbohidratos y fibra no se realizó, ya que la pechuga de pollo carece de éstos.

## **II. B ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

Se realizó un análisis para conocer la calidad microbiológica en los deshidratados de pechuga de pollo elaborados, y así determinar si los deshidratados son para las pruebas biológicas y posteriormente aptos para consumo humano.

Las técnicas que se siguieron están basadas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y Normas Oficiales Mexicanas como se muestra en el Anexo II y que respectan a los siguientes análisis:

- Mesofilos aerobios
- Coliformes
- Escherichia coli
- Salmonella
- Staphylococcus aureus
- Hongos y Levaduras

## **II. C DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS**

Los aminoácidos se determinaron en un autoanalizador con columna de intercambio iónico en el orden de elución correspondiente: (Anexo III)

1. Ácido aspártico
2. Ácido glutámico
3. Treonina
4. Serina
5. Prolina
6. Cisteína
7. Alanina + Glicina
8. Valina
9. Metionina
10. Isoleucina
11. Leucina
12. Tirosina
13. Fenilalanina
14. Lisina
15. Histidina
16. Arginina

Y por último se determino triptófano por colorimetría con el complejo de p-dimetil-amino-benzaldehido que forma compuestos coloridos con el grupo indol del triptófano a 590 nm (Anexo VI).

## **II. D DETERMINACIÓN DE CALIDAD PROTEÍICA POR MÉTODOS BIOLÓGICOS(Razón de eficiencia proteínica y digestibilidad aparente de la proteína)**

Para determinar el valor nutritivo de la proteína presente en los deshidratados de la pechuga de pollo, se realizó el estudio de REP (razón de eficiencia proteínica), estudiándose el crecimiento del animal bajo condiciones bien definidas. Dicho crecimiento esta ligado intrínsecamente con la cantidad y disponibilidad de aminoácidos en la proteína en estudio, la cual, debe estar suministrada en una dieta isoproteínica e isocalórica realizando a la par una dieta de referencia (caseína).

Otro de los parámetros que se midió fue la digestibilidad aparente de la proteína que también es un indicador de la calidad proteínica y de la disponibilidad de los aminoácidos que la componen. Esta digestibilidad fue obtenida in vivo con las ratas machos utilizadas en el REP.

Para ambos estudios se contó con cuatro lotes de seis ratas clasificadas y distribuidas en cada uno de los lotes de acuerdo a su peso, las dietas y el resto del experimento se basaron en las técnicas citadas en el A.O.A.C. mostradas en el Anexo IV.

## **II. E ANÁLISIS FÍSICO**

Para conocer el comportamiento físico de los polvos obtenidos se determinaron distintos parámetros que se utilizan generalmente con fines comerciales, como cuanto pesan, que tan solubles y estables en suspensión son, su velocidad de flujo al ser transportados, etc.

Dichas determinaciones se encuentran descritas en el Anexo V, correspondiendo a las siguientes determinaciones:

- Densidad aparente
- Pruebas de reconstitución (Volumen de Sedimentación y Solubilidad)
- Pruebas reológicas (Angulo de reposo y velocidad de flujo)

### III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.A ANÁLISIS PROXIMAL

Se realizó el análisis proximal de las tres muestras de pollo (pollo crudo "PC", pollo cocido y seco en estufa de aire "PE" y pollo cocido y seco por aspersión "PS"). Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla III.A.1 Composición proximal de las muestras obtenidas.

Base Húmeda

DETERMINACIÓN	PC g/100 g	PE g/100 g	PS g/100 g
Humedad	<b>5.86 ± 0.098</b>	<b>2.04 ± 0.127</b>	<b>2.45 ± 0.088</b>
Cenizas	<b>2.60 ± 0.023</b>	<b>2.81 ± 0.018</b>	<b>2.74 ± 0.022</b>
Proteína (N X 6.25)	<b>81.49 ± 0.351</b>	<b>84.81 ± 0.286</b>	<b>85.71 ± 0.391</b>
Grasa Cruda	<b>7.45 ± 0.752</b>	<b>9.66 ± 0.691</b>	<b>8.70 ± 0.275</b>

\* Resultados obtenidos por triplicado

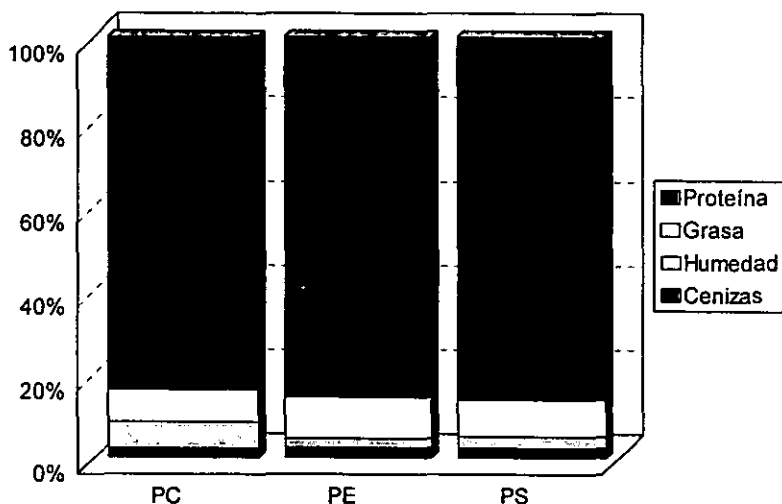
\* Es el promedio de tres determinaciones

Tabla III.A.2 Composición proximal de las muestras de pollo.

Base Seca

DETERMINACIÓN	PC g/100 g	PE G/100 g	PS g/100 g
Cenizas	<b>2.77</b>	<b>2.87</b>	<b>2.81</b>
Proteína (N X 6.25)	<b>86.57</b>	<b>86.58</b>	<b>87.87</b>
Grasa Cruda	<b>7.92</b>	<b>9.87</b>	<b>8.92</b>

Figura III.A.3 Composición porcentual de las muestras obtenidas



Una vez obtenidos los resultados es necesario saber si existen diferencias entre las diferentes muestras con respecto a los análisis obtenidos experimentalmente, para ello se necesita utilizar las herramientas estadísticas que se acoplen al modelo experimental.

Para aplicar el ANOVA es necesario distinguir que este tipo de análisis sirve para comparar medias de los resultados obtenidos y determinar si existe diferencia significativa (5 % de confianza) o diferencia muy significativa (1 %), y que no exista diferencia estadística entre las muestras analizadas.<sup>62</sup>

Tabla III.A.4 ANOVA de los análisis proximales obtenidos.

Fuente de Variación	g.l.	SC	CM	F cal.	Criterio
Tipo de muestra	2	0.7170	0.3585	0.10524	Sin diferencia
Tipo de determinación	3	14132.4519	4710.8173	1382.9313	**
Error	6	20.4384	3.4064		
Total	11	14153.6073			



- g.l. Grados de libertad
- SC Suma de cuadrados
- CM Cuadrados medios
- F cal. Relación de variación (F calculada)
- \* Diferencia significativa
- \*\* Diferencia muy significativa

Para tomar los criterios es necesario consultar las tablas de F y comparar los resultados del valor experimental y del teórico.<sup>63</sup>

- Tipo de muestra

F teóricas > F experimental ∴ No existe diferencia entre las muestras.

$$F_{2,6,05} = 5.14 \quad F_{2,6,01} = 10.92$$

- Tipo de determinación

F teóricas < F experimental ∴ Existe diferencia muy significativa entre las determinaciones un nivel de significancia de 1 %.

$$F_{3,6,05} = 4.76 \quad F_{3,6,01} = 9.78$$

Si se toma los datos obtenidos estadísticamente (Tabla III.A.4) se encuentra que no existe diferencia entre las muestras obtenidas. Esto corrobora que se partió del mismo lote con las mismas características iniciales. La diferencia radica en el proceso tecnológico involucrado en su elaboración de los diferentes tipos de secado.

Con respecto a la diferencia muy significativa entre las determinaciones es de suponerse ya que todas son muy independientes entre sí, y compararlas no tiene caso, ya que solo sirvieron para el tratamiento estadístico.

Si se toma cada una de las muestras por separado (Tabla III.A.1), se pueden observar características muy especiales. Si se empieza con la humedad de los deshidratados, la cual es determinante para la estabilidad y vida de anaquel del producto, de las tres muestras se observa que la de mayor contenido de humedad es la del pollo crudo en la cual se cree que existe una capa fuertemente unida de agua y de grasa a la proteína no desnaturalizada por un pre-tratamiento térmico antes del secado. Esta humedad permite un deterioro mayor con respecto a las dos muestras, teniendo

por lo tanto una menor vida de anaquel y menor biodisponibilidad de las proteínas cada vez que transcurre más tiempo.

Las otras dos muestras (PE y PS) al provenir de pollo cocido y seco posteriormente, se nota un ligero aumento en la cantidad de grasa y de proteína por lo que sugiere que el tratamiento térmico desnaturalizó a las proteínas de la pechuga de pollo exponiendo estos nutrimentos facilitando su cuantificación. En estas muestras la humedad se ven disminuida, debido a que la proteína no puede ser capaz de retener esta agua en forma de enlaces moleculares como sucedía en el pollo crudo (Tabla III.A.1). Con respecto al pollo cocido y seco por atomización se observa una exposición un poco mayor de las proteínas y un encubrimiento de la grasa, en donde la respuesta de esta diferencia, esta en la forma granular de los polvos, en donde el pollo formó pequeños núcleos en forma de esfera en donde la proteína es la parte exterior con un centro lipofílico. Este tipo de protección sugerida conviene, ya que, la grasa al tener una cinética de degradación o transformación mayor que la que tiene la proteína pueda tener mayor estabilidad química.

### III.B ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Para poder determinar uno de los factores de la estabilidad de los deshidratados de pollo obtenidos es imprescindible conocer su calidad microbiológica de las muestras obtenidas como se muestra en la figura III.B.1

Tabla III.B.1 Análisis Microbiológico de las muestras

	Mesófilos UFC/g	Coliformes (NMP)	E.coli	Salmonella	S.aureus	Hongos UFC/g	Levaduras UFC/g
PC	<b>8700</b>	<b>&lt;3</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>30</b>	<b>38</b>
PE	<b>3200</b>	<b>&lt;3</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>15</b>	<b>10</b>
PS	<b>1500</b>	<b>&lt;3</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>&lt;10</b>	<b>&lt;10</b>

A = Ausente en 10 g de muestra

De los resultados de los análisis microbiológicos se pueden recomendar su uso en la alimentación humana, ya que no representan un riesgo potencial para la salud.

De las muestras analizadas la que representa una mayor contaminación microbiana es la de pollo crudo, esta contaminación se debe a que este pollo fue manipulado desde su obtención hasta su transporte, aunque cabe mencionar, que este pollo se manejo con buenas prácticas de higiene y sanidad, de lo contrario la calidad microbiológica hubiese sido aún mayor repercutiendo probablemente en la utilización de este producto para las pruebas biológicas realizadas. Aunque la calidad microbiológica no fue mala si se debe considerar que es un producto crudo al cual se deben tener precauciones si se quisiera utilizar, por lo que se recomienda un tratamiento posterior para disminuir la carga microbiana, por ejemplo el uso de energía ionizante.

Del pollo cocido y seco por estufa se observa una contaminación ambiental, ya que este pollo fue cocido en el autoclave a temperaturas de esterilización, la contaminación ocurrió durante el secado en la estufa o durante la molienda final en lo que destaca la presencia de levaduras y hongos.

Del pollo cocido en autoclave y luego seco por spray se observa una reducción importante de contaminación ambiental, ya que este producto no esta expuesto tanto tiempo como los otros durante el periodo de secado y no requirió un proceso posterior de molienda, además de que es factible incluso un producto totalmente estéril. Dicha característica no es posible en un laboratorio que no mantiene las condiciones óptimas para un producto libre de microorganismos.

### **III.C DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS**

Para poder tener una buena relación entre el contenido de proteína y su calidad, se tienen que determinar parámetros como el contenido de aminoácidos de las muestras, y así poder conocer el efecto que tiene el tipo de tratamiento que se aplicó a la pechuga de pollo para obtener los tres tipos de deshidratados.

Tabla III.C.1 Composición de aminoácidos de las muestras obtenidas

Aminoácido	Pollo crudo y seco en estufa <i>g/16 g N</i>	Pollo cocido y seco en estufa <i>g/16 g N</i>	Pollo cocido y seco por Atomización <i>g/16 g N</i>
Acido aspártico	<b>9.34 ± 0.231</b>	<b>9.36 ± 0.018</b>	<b>9.36 ± 0.136</b>
Acido glutámico	<b>12.03 ± 0.214</b>	<b>12.03 ± 0.127</b>	<b>12.04 ± 0.218</b>
Treonina	<b>3.86 ± 0.341</b>	<b>3.60 ± 0.256</b>	<b>3.92 ± 0.231</b>
Serina	<b>3.73 ± 0.025</b>	<b>3.72 ± 0.152</b>	<b>3.73 ± 0.112</b>
Prolina	<b>4.12 ± 0.029</b>	<b>4.11 ± 0.101</b>	<b>4.15 ± 0.098</b>
Cisteína	<b>2.56 ± 0.027</b>	<b>2.58 ± 0.025</b>	<b>2.58 ± 0.037</b>
Alanina + Glicina	<b>6.12 ± 0.198</b>	<b>6.07 ± 0.104</b>	<b>6.08 ± .0164</b>
Valina	<b>4.58 ± 0.264</b>	<b>4.62 ± 0.157</b>	<b>4.62 ± 0.201</b>
Metionina	<b>1.59 ± 0.231</b>	<b>1.62 ± 0.124</b>	<b>1.89 ± 0.197</b>
Isoleucina	<b>2.16 ± 0.209</b>	<b>2.29 ± 0.059</b>	<b>2.28 ± 0.107</b>
Leucina	<b>5.23 ± 0.245</b>	<b>5.36 ± 0.241</b>	<b>5.37 ± 0.196</b>
Tirosina	<b>3.26 ± 0.135</b>	<b>3.25 ± 0.128</b>	<b>3.26 ± 0.103</b>
Alanina	<b>3.40 ± 0.124</b>	<b>3.26 ± 0.162</b>	<b>3.56 ± 0.209</b>
Lisina	<b>7.93 ± 0.131</b>	<b>8.04 ± 0.135</b>	<b>8.12 ± 0.289</b>
Histidina	<b>2.33 ± 0.039</b>	<b>2.33 ± 0.104</b>	<b>2.45 ± 0.010</b>
Arginina	<b>5.43 ± 0.132</b>	<b>5.38 ± 0.146</b>	<b>5.52 ± 0.152</b>
Triptofano	<b>1.17 ± 0.138</b>	<b>1.18 ± 0.176</b>	<b>1.23 ± 0.156</b>
AA limitante	<b>Iso</b>	<b>Iso</b>	<b>Iso</b>

De las determinaciones, no se encuentra diferencia en el contenido de los aminoácidos en los distintos tipos de pechuga de pollo deshidratada.

Los aminoácidos en este caso no fueron modificados o disminuidos por las temperaturas de cocción ni de secado.

Con respecto a los aminoácidos determinados se puede calcular la calificación química de las tres muestras, determinando antes que nada el aminoácido limitante, que para las tres muestras, fue la Isoleucina (Tabla III.C.3), dicho aminoácido puede ser compensado con la suplementación de otros alimentos ricos en este aminoácido deficiente en el pollo como pueden ser algunos cereales.

Las calificaciones químicas nos indican que la proteína al ser muy deficiente en la isoleucina, puede clasificarse como una proteína regular a buena en comparación a la proteína de huevo que se toma como patrón.<sup>18</sup>

Si se observa la siguiente tabla resulta interesante que la concentración de aminoácidos como la lisina, triptófano y los azufrados se encuentran en cantidades elevadas.

Tabla III.C.3 Calificación química.  
FAO /OMS 1973

Pollo crudo y seco por estufa (PC)

Aminoácido	g / 100 g de proteína FAO	g / 100 g de proteína	Calificación Química
Isoleucina	4.0	2.29	<b>57.2</b>
Leucina	7.0	5.36	76.6
Lisina	5.5	8.04	>100.0
Metionina+ Cisteína	3.5	4.20	>100.0
Fenilalanina+Tirosina	6.0	6.51	>100.0
Treonina	4.0	3.60	90.0
Triptófano	1.0	1.18	>100.0
Valina	5.0	4.62	92.4

Aminoácido Limitante : **Isoleucina**  
Score químico : **57.25**

Pollo cocido y seco por estufa (PE)

Aminoácido	g / 100 g de proteína FAO	g / 100 g de proteína	Calificación Química
Isoleucina	4.0	2.16	<b>54.0</b>
Leucina	7.0	5.23	74.7
Lisina	5.5	7.93	>100.0
Metionina+ Cisteína	3.5	4.15	>100.0
Fenilalanina+Tirosina	6.0	6.66	>100.0
Treonina	4.0	3.86	96.5
Triptófano	1.0	1.17	>100.0
Valina	5.0	4.58	91.6

Aminoácido Limitante : **Isoleucina**  
Score químico : **54.00**

Pollo cocido y seco por spray (PS)

Aminoácido	g / 100 g de proteína FAO	g / 100 g de proteína	Calificación Química
Isoleucina	4.0	2.28	<b>57.0</b>
Leucina	7.0	5.36	76.7
Lisina	5.5	8.12	>100.0
Metionina+ Cisteína	3.5	4.47	>100.0
Fenilalanina+Tirosina	6.0	6.82	>100.0
Treonina	4.0	3.92	98.0
Triptófano	1.0	1.23	>100.0
Valina	5.0	4.62	92.4

Aminoácido Limitante : **Isoleucina**  
 Score químico : **57.00**

### III.D DETERMINACION DE CALIDAD PROTEÍNICA POR MÉTODOS BIOLÓGICOS

Una vez que se conoció la composición química y microbiológica de las muestras, se procedió a elaborar las siguientes dietas para probar la calidad de la proteína de pollo obtenida en base a la formulación indicada en los anexos para lo que fue necesario determinar la composición química proximal de la muestra de referencia.

Tabla III.D.1 Análisis Proximal de la Caseína

Humedad	Proteína	Cenizas	Grasa
3.0	89.4	0.58	0.23

Tabla III.D.2. Fórmula basal de las dietas para las pruebas biológicas

	Caseína (g/100 g de dieta)	PC (g/100 g de dieta)	PE (g/100 g de dieta)	PS (g/100 g de dieta)
Fuente proteínica	11.18	11.55	11.55	11.38
Aceite de Maíz	7.97	7.13	6.88	7.00
Mezcla de Sales USP	4.93	4.69	4.67	4.68
Mezcla de Vitaminas	1.00	1.00	1.00	1.00
Celulosa	1.00	1.00	1.00	1.00
Agua	4.66	4.32	4.76	4.72
Almidón	69.25	70.31	70.23	70.22
Total	100 g	100 g	100 g	100 g
Proteína Determinada	9.86±0.012	12.88±0.325	11.80±0.052	9.60±0.053

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la prueba biológica realizada durante tres semanas con cuatro lotes de seis ratas, el primero de referencia (Caseína), pollo crudo y seco (PC), pollo cocido y seco en estufa (PE) y el pollo cocido y seco por aspersión. En dicha tabla se indican los valores individuales de cada lote y su respectivo promedio con su desviación estándar.

Para poder realizar una comparativa es necesario ajustar los lotes al valor de referencia (2.5) el cual se llama REP ajustado.

El coeficiente de variabilidad no debe ser mayor a 10 % para que este experimento tenga validez estadística y experimental.

Tabla III.D.3 Valores de Razón de Eficiencia Proteínica (REP)

	CASEÍNA	PC	PE	PS
Rata 1	2.620	2.760	2.820	2.924
Rata 2	2.821	2.451	2.950	2.855
Rata 3	2.595	2.714	2.757	3.103
Rata 4	2.798	2.398	2.544	2.980
Rata 5	3.014	2.272	2.461	2.875
Rata 6	2.639	2.469	2.849	3.016
Promedio	<b>2.748</b>	<b>2.511</b>	<b>2.73</b>	<b>2.959</b>
Desviación estándar	0.162	0.189	0.189	0.093
Coefficiente de Variabilidad	5.878	6.845	6.703	3.188
REP ajustado	<b>2.500</b>	<b>2.284</b>	<b>2.484</b>	<b>2.692</b>

Para poder conocer si existe diferencia entre los resultados obtenidos, es necesario realizar el estadístico de ANOVA.

Tabla III.D.4 ANOVA de REP. (Sin Ajuste de REP con la Caseína)

Fuente de Variación	g.l.	SC	CM	F cal.	Criterio
Tipo de muestra	3	0.6036	0.2012	6.46529563	**
Ratas	5	0.0638	0.0127	0.41002571	Sin Diferencia
Error	15	0.4668	0.0311		
Total	23	1.1342			

- g.l. Grados de libertad
- SC Suma de cuadrados
- CM Cuadrados medios
- F cal. Relación de variación (F calculada)
- \* Diferencia significativa
- \*\* Diferencia muy significativa



Para tomar los criterios es necesario consultar las tablas de F y comparar los resultados del valor experimental y del teórico.<sup>62</sup>

- Tipo de muestra

F teóricas < F experimental ∴ Existe diferencia muy significativa entre las muestras a un nivel de significancia de 1 %.

$$F_{3,15,05} = 3.24 \quad F_{3,15,01} = 5.29$$

- Ratitas utilizadas en el experimento

F teóricas > F experimental ∴ No existe diferencia significativa entre las determinaciones un nivel de significancia de 1 %.

$$F_{5,15,05} = 2.85 \quad F_{5,15,01} = 4.44$$

Ya que hubo una diferencia entre los resultados del REP para cada una de las dietas elaboradas, se aplica una segunda herramienta estadística que es la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (DMS). La fórmula de esta es la siguiente:  $DMS = t\sqrt{2CMe/n}$

En donde:

t = valor de t de Student de tabla para una cola, a los grados de libertad del error. Seleccionando el nivel de significancia que se haya detectado en la relación de variación de (F).

n = número de determinaciones (6 Ratitas)

t al 1 % a una cola con g.l. de 15 = 2.94.7

Sustituyendo,  $DMS = 2.947\sqrt{2*0.0311/6}$

$$DMS = 0.3001$$

Para el cálculo se ordenan por orden decreciente los valores de sus medias

Pollo cocido y seco por spray (PS)	Caseína (C)	Pollo crudo y seco por estufa (PE)	Pollo cocido y seco por estufa (PC)
2.9588	2.7478	2.7301	2.5106

Posteriormente se compara el valor de la diferencia entre las medias con el valor calculado DMS. Aquellos valores mayores al DMS indican diferencia significativa al 1 % entre dichas muestras.

O sea, restando para determinar el rango de diferenciación

$$PS - \text{Caseína} = 0.2110 < 0.3001$$

$$PS - PE = 0.2110 < 0.3001$$

$$PS - PC = 0.4482 > 0.3001$$

$$\text{Caseína} - PE = 0.0177 < 0.3001$$

$$\text{Caseína} - PC = 0.2372 < 0.3001$$

$$PE - PC = 0.2195 < 0.3001$$

∴ Las muestras PS, C y PE son las que tienen un valor de REP mayor y no se diferenciaron entre sí de manera significativa. La muestra de PC señala un REP menor significativamente con respecto a PS, pero con respecto a C, y PE no hay diferencia a un nivel de significancia del 1 %.

PS    Caseína    PE    PC

La estadística menciona que la dieta elaborada a base de pollo cocido y seco por spray es el que mayor REP tuvo pero sin diferencia significativa con PE, lo que significa que aunado a los otros análisis realizados es el producto deshidratado con mayores ventajas dentro de las cuales se pueden mencionar, su calidad microbiológica aceptable, una proteína desnaturalizada de mayor biodisponibilidad como se observa en las pruebas biológicas y como se podrá observar a continuación con una mayor digestibilidad, en la Tabla III.D.6.

En la Figura III.D.5 se observa la gráfica de la curva de crecimiento de las cuatro dietas estudiadas, en las cuales se ve una tendencia lineal entre el crecimiento de la

rata registrado en peso, con respecto al tiempo. Sin embargo este crecimiento acumulativo con respecto al tiempo depende también del alimento ingerido, en donde las ratas del pollo crudo consumieron más pollo, esto se debe a la baja calidad de la proteína, donde la conversión de proteína ingerida fue menor .

Figura III.D.5. Curva de Crecimiento (Crecimiento acumulativo (g) Vs. Tiempo en días)

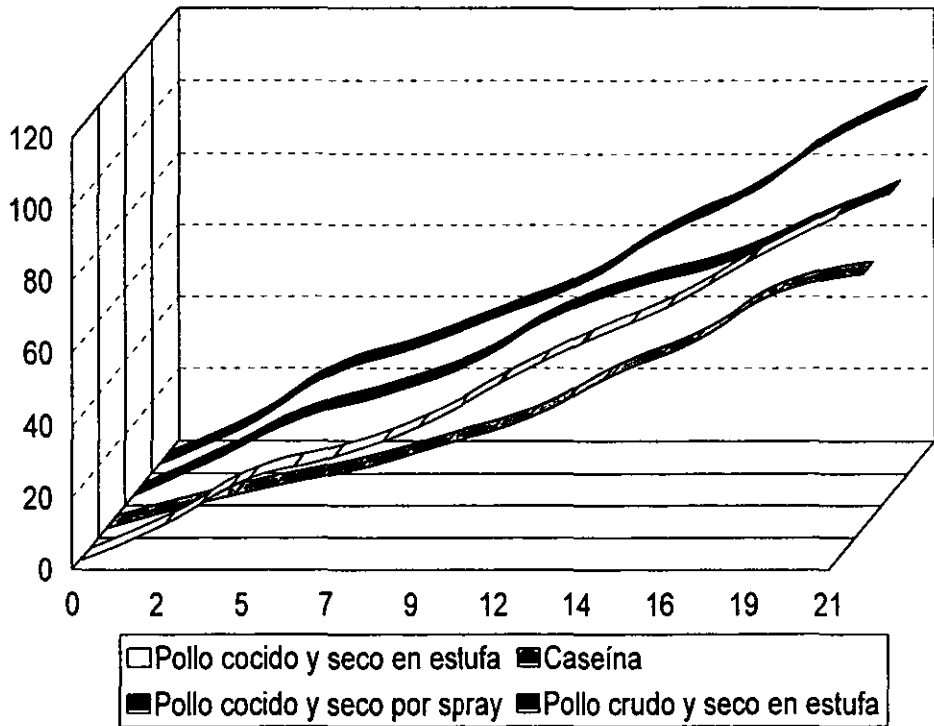


Tabla III.D.6 Digestibilidad de las dietas elaboradas a partir de la fuente proteínica en estudio

	Digestibilidad ( %)
Caseína	89.89 ± 1.39
Pollo crudo y seco por estufa	90.43 ± 1.30
Pollo cocido y seco por estufa	89.63 ± 2.32
Pollo cocido y seco por spray (PS)	91.43 ± 1.02

Número de ratas por lote = 6

La digestibilidad esta relacionada con el tratamiento que haya tenido la proteína pudiendo asegurar hasta este momento que la que mostró mayor eficacia es el pollo seco por aspersión el cual al darle un tratamiento de cocción permitió una mayor biodisponibilidad de las proteínas desnaturalizadas y el secado contribuyo a que los aminoácidos de la proteína, y sus características de digestibilidad permanecieran casi intactas.

### III.E ANÁLISIS FÍSICO

Para poder determinar el uso que se le puede dar a este polvo a nivel industrial se tiene que conocer sus características físicas para manejarlo, transportarlo y almacenarlo, la densidad aparente es un parámetro de transportación, ya que entre menos volumen ocupe una determinada cantidad menor va a ser el costo de transporte, es decir más peso en poco espacio.

Tabla III.E.1 Resultados de densidad aparente

MUESTRA	DENSIDAD APARENTE ( g / cm <sup>3</sup> )
Pollo Crudo y Seco por Estufa	3.1
Pollo Cocido y Seco por Estufa	1.5
Pollo Cocido y Seco por Spray	0.85

En esta tabla se puede imaginar las características propias de cada polvo, en el pollo cocido y seco en la estufa se observa una densidad mayor con respecto a las otras dos, esto se debe a que el pollo al tener un proceso de cocción las fibras musculares son más susceptibles por que pierden la capacidad de retener agua molecular y tener espacios intersticiales. Este polvo se compacta aún más cuando se somete a un proceso de molienda. En cuestiones comerciales este polvo es ideal para el transporte.

Con respecto al polvo obtenido del pollo crudo, se observa una tendencia contraria a lo descrito anteriormente, aquí existen muchos espacios difíciles de romper aún con la molienda por lo que la densidad aparente de este polvo es la mitad del polvo de pechuga de pollo cocida y seca en la estufa.

En el deshidratado de pollo seco por aspersión se obtiene una densidad mucho menor que el primer caso, ya que este al secarse se volvió muy esponjoso manteniendo espacios de aire entre las proteínas, por lo que comercialmente este polvo no conviene por cuestiones de manejo y de transporte.

Otro de los parámetros que se miden en un polvo es la capacidad de reconstitución, ya que aquí entra la parte de que tan fácil es de incorporarse a una formulación alimenticia. En la Tabla III.E.2 se muestra que el pollo más soluble es el pollo seco por aspersión y también es el polvo más estable a la coalescencia, esto se debe a que la mayoría de los polvos secados por aspersión, probablemente el polvo actúa como un emulsificante exponiendo sus partes hidrófilas hacia el exterior y sus partes lipofílicas al interior, dándoles de esta manera más estabilidad a la suspensión. En los otros dos casos no se observa dicho fenómeno de solubilidad, ya que estos polvos sólo están fragmentados teniendo poca interacción o estabilidad en solución.

El volumen de sedimentación está directamente ligado a lo que es la solubilidad, observándose que a mayor solubilidad mayor es el volumen de sedimentación (cabe recordar que este parámetro de sedimentación es una medida empírica y que cuando tiende a cero la relación significa que todo sedimento ya que es una relación inversamente proporcional).

Tabla III.E.2 Resultados de las pruebas de reconstitución

MUESTRA	VOLUMEN DE SEDIMENTACIÓN	SOLUBILIDAD (%)
Pollo Crudo y Seco por Estufa	0.4108	31.25
Pollo Cocido y Seco por Estufa	0.4302	32.05
Pollo Cocido y Seco por Spray	0.4709	38.01

Para poder determinar que tipo de bombas transportadoras de polvos, tolvas o cilios de almacenaje se deben utilizar es necesario conocer los parámetros empíricos de velocidad de flujo y ángulo de reposo, en la tabla III.E.3 se observan los resultados obtenidos.

Tabla III.E.3 Resultados de las pruebas reológicas

MUESTRA	ANGULO DE REPOSO	VELOCIDAD DE FLUJO (g/s)
Pollo Crudo y Seco por Estufa	41	0.3103
Pollo Cocido y Seco por Estufa	40	0.3501
Pollo Cocido y Seco por Spray	No determinado	No determinado

Estos parámetros así como la densidad aparente nos indican de forma muy empírica el aspecto de los polvos estudiados, aquí se correlacionan la densidad aparente y la estructura granular de cada uno de los polvos, en donde como ya se mencionó el polvo obtenido después del secado de aspersion al ser demasiado poroso, poco denso y "pegajoso" se adhirió a las paredes del dispositivo no pudiéndose determinar dicha característica. Los demás polvos pudieron pasar a través del embudo y así poder determinar dichos parámetros, pudiendo relacionar que a mayor velocidad de flujo menor es el ángulo de reposo, dicha característica es ideal para transportar polvos y colocarlos en contenedores, ya que se aprovecha todos los espacios del contenedor y no se tienen problemas de "pirámides de polvos". Con lo que respecta al polvo que se obtuvo después del secado por aspersion se recomienda utilizar un antiglomerante

como puede ser el dióxido de silicio, el cual permitiría una mayor solubilidad, estabilidad del producto al deterioro y una mayor fluidez.<sup>58</sup>

Otra de las pruebas que se determino fue la estabilidad al calor de las muestras obtenidas, sin embargo al tener un alto contenido de proteínas y no tener ningún estabilizante como pudo ser un emulsificante ninguna de las muestras fue estable como se observa a continuación en la Tabla III.E.4

Tabla III.E.4 Estabilidad al calor

MUESTRA	( 7 LB/ 15 MIN)
Pollo Crudo y Seco por Estufa	No Estable
Pollo Cocido y Seco por Estufa	No Estable
Pollo Cocido y Seco por Spray	No Estable

De los datos obtenidos se puede determinar que en aspectos físicos el mejor polvo de pechuga de pollo deshidratado fue el de pollo cocido y seco en estufa, sin embargo nutricionalmente no es el más apto, por lo que se recomienda el uso de un antiglomerante y utilizar el pollo seco por aspersión.

De los tres polvos el más económico en aspecto de producción es el pollo crudo y seco en estufa, sin embargo el riesgo microbiológico lo hace un producto de alto riesgo, además de tener una biodisponibilidad menor a los otros dos. Si se observa el costo beneficio que pueda tener este tipo de deshidratado en la alimentación el pollo cocido y seco por aspersión supera a cualquiera de los polvos obtenidos.

## **IV CONCLUSIONES**

El secado por aspersión es la metodología más adecuada para la obtención de pechuga de pollo deshidratada con una cantidad y calidad proteínica y bajo contenido de grasa. La harina obtenida posee buenas características en cuanto a análisis proximal, calidad de la proteína que se ve reflejada en el bioensayo REP y la digestibilidad, los cuales fueron mayores que la proteína de referencia (caseína). En cuanto a condiciones microbiológicas este polvo resultó el más adecuado, ya que este producto no está expuesto a un tiempo prolongado a la contaminación atmosférica y su baja humedad permite que este polvo tenga mayor estabilidad química al deterioro.

Con respecto a sus características de ángulo de reposo y velocidad de flujo que no se pudieron determinar en este polvo, se sugiere el uso de un antiaglomerante, que puede resultar benéfico para la estabilidad y manejo de este polvo, al darle mayor fluidez, y protegerlo de la humedad que pueda rodear el polvo que es altamente higroscópico debido a su naturaleza proteínica y al mismo tiempo hacer que este polvo sea más soluble.

De esta forma se podría utilizar este polvo para fórmulas dirigidas a la alimentación especial, pues no se requiere de grandes volúmenes de producto para satisfacer el requerimiento proteínico necesario, ya que este polvo es un concentrado. Al ser un concentrado con dichas características puede tener uso en el área clínica en hospitales o en el área de la industria alimentaria.

## **V RECOMENDACIONES**

- Adicionar un antiaglomerante a la pechuga de pollo deshidratada en polvo (dióxido de silicio)
- Conocer la cinética y factores que ayuden a determinar la vida de anaquel del producto
- Utilizar el polvo de pechuga de pollo en formulaciones infantiles y geriátricas
- Adicionar el pollo deshidratado a alimentos que necesiten fortificación proteínica.



## **VI ANEXOS**

### **VI A ANALISIS PROXIMAL**

#### **VI.A.1 Humedad al vacío<sup>3</sup>**

Fundamento:

La pérdida de material que se volatiliza bajo ciertas condiciones de temperatura, se denomina humedad.

Material:

- Estufa de vacío LAB-LINE Mod.3620 (60 – 65 ° C)
- Desecador
- Balanza analítica
- Charolas de aluminio

Procedimiento:

1. Poner a peso constante las charolas de aluminio en una estufa de vacío a una temperatura de 60-65 °C durante 2 a 4 horas.
2. Pesar de 2 a 5 g de muestra en cada charola y colocarlas en la estufa para su secado.
3. Se saca la charola y se coloca en el desecador, se deja enfriar hasta la temperatura ambiente y se pesa. La determinación concluye hasta que las charolas quedan a peso constante o hasta que dos pesadas sucesivas no registren una diferencia de más de 0.001 g.

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = (P_i - P_f) / m \times 100$$

m = muestra en gramos

P<sub>i</sub> = Peso inicial en gramos

P<sub>f</sub> = Peso final en gramos

## VI.A.2

## Cenizas<sup>3</sup>

Fundamento:

Las cenizas son el residuo inorgánico que se obtiene después de la incineración de una muestra, estas corresponden al material inorgánico.

Material:

- Mufla THERMOLYN Mod.1500
- Balanza analítica
- Desecador
- Cisoles de porcelana

Procedimiento:

1. Poner los crisoles a peso constante en la mufla a una temperatura entre 500 y 550 °C.
2. Pesar en el crisol de 2 a 5 g de muestra y carbonizar con ayuda de un mechero hasta que deje de salir humo.
3. Colocar el crisol en la mufla (500-550 °C) durante el tiempo necesario para obtener cenizas blancas o grises homogéneas, sin puntos negros. En caso de presentar puntos negros, pueden agregarse unas gotas de agua destilada a las cenizas frías y meterlas nuevamente a la mufla hasta que queden homogéneas.
4. Dejar enfriar un poco los crisoles y colocarlos en un desecador, dejar enfriar hasta temperatura ambiente y pesar. Los crisoles con las cenizas deben estar a peso constante.

Cálculos :

$$\% \text{ Cenizas} = ( Pf - Pi ) / m \times 100$$

m = muestra en gramos

Pi = Peso inicial en gramos del crisol sin muestra

Pf = Peso final en gramos del crisol con muestra incinerada

### VI.A.3 Proteína<sup>3</sup>

Fundamento:

La determinación se realiza en base al método Kjeldahl, el cual consta de una oxidación de la muestra orgánica mediante la acción de  $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$  y  $H_2O_2$ , en presencia de un catalizador ( $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ ), como resultado de esta oxidación se produce  $CO_2$ ,  $H_2O$  y  $N_2$  el cual se retiene en forma de  $NH_4HSO_4$ . Para la liberación de  $NH_3$  de la sal formada, se realiza una destilación en presencia de NaOH al 60% y el amoniaco liberado es recibido en ácido bórico formándose borato de amonio el cual es titulado con una solución de HCl 0.01 N. De este modo se sabe la cantidad de Nitrógeno que se liberó de la muestra el cual se multiplica por un factor que nos da el por ciento de proteína de la misma.

Material y reactivos :

- Digestor TECATOR Mod. AB-20140
- Destilador y titulador automático TECATOR
- Tubos para digestión de 75 ml TECATOR
- Mezcla digestiva (a)
- Hidróxido de sodio al 60% R.A.
- Sulfato de potasio R.A.
- Peróxido de hidrógeno al 30% R.A.
- Acido bórico con indicadores (b)
- Acido clorhídrico valorado 0. 01 N

Preparación :

a) Mezcla digestiva: disolver 3g de sulfato de cobre ( $CUSO_4 \cdot 5H_2O$ ) en 20 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) concentrado y 430 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado resbalándolo por la pared. Agitar la mezcla durante 10 minutos.

b) Acido bórico con indicadores-. disolver 10 g de ácido bórico y disolverlos en agua destilada, adicionar 70 ml de indicador A (100 mg de fenofaleína disueltos y aforados a

100 con etanol) y 20 ml de indicador B (33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo disueltos y aforados a 100 con etanol) llevar a un volumen final de 2000 ml con agua destilada. Se ajusta el ácido bórico a un color café-rojizo.

Procedimiento:

#### DIGESTION.

1. Pesar de 20 a 60 mg de muestra finamente molida en un tubo de digestión, agregar 0.5 g de ( $K_2SO_4$ ) y 3 ml de mezcla digestiva.
2. Colocar el tubo en el digestor previamente calentado a una temperatura inferior a 370 °C, durante 15 min. (predigestión).
3. Transcurrido el tiempo de predigestión, sacar el tubo del digestor y dejarlo enfriar, adicionar 1.5 ml de  $H_2O_2$  y colocar el tubo nuevamente en el digestor a 370 °C hasta que el contenido del tubo sea translúcido, sin restos de materia orgánica ni colocaciones fuertes. Dejar enfriar el tubo antes de efectuar la destilación.

#### DESTILACION Y TITULACIÓN.

1. Agregar 25 ml de agua destilada a cada uno de los tubos de digestión
2. Colocarlos en el equipo destilador y titulador automático, corriendo primero el blanco que previamente se preparó
3. Anotar los ml de HCl usados en la titulación del blanco y de las muestras los cuales los muestra la pantalla de resultados del equipo utilizado.

Cálculos:

$$\%N = \frac{(P - B) \times N \times meq \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

P= ml de HCl 0.01 N usados para titular la muestra

B=ml de HCl 0.01 N usados para titular el blanco

N= Normalidad de la solución de HCl

meq= milliequivalentes de nitrógeno (0.014)

F= Factor de conversión (6.25)

m = muestra en gramos

#### **VI.A.4 Grasa Cruda** <sup>3,22</sup>

Fundamento:

La determinación se basa en la solubilidad de las grasas en éter, la cantidad de material extraído de una muestra mediante el reflujo con éter se denomina extracto etéreo o grasa cruda e incluye grasa verdadera, ácidos grasos, aceites esenciales, ésteres, vitaminas liposolubles y carotenoides principalmente. En este análisis se propuso una modificación previa, en la cual se tomó como ejemplo la determinación de grasa en leche, en donde se liberan los glóbulos de grasa que se encuentran embebidos en la matriz proteica.<sup>22</sup>

Material y Reactivos:

- Equipo de extracción Goldfish LABCONCO
- Balanza analítica
- Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm.
- Vasos de borde esmerilado KIMAX
- Estufa de vacío LAB-LINE Mod.3620
- Eter de petróleo R.A.
- Celulosa ( Non nutritive fiber-cellulose type Cat No. 1600390 A.HSD )
- Solución de KOH al 20 %
- Etanol Absoluto

Procedimiento:

1. Pesar de 2 g de muestra en un recipiente, y agregar 2 ml de etanol absoluto.
2. Inmediatamente agregar 0.75 ml de KOH al 20 %.
3. Se suspende y absorbe esta pasta en 3 g de celulosa, transferir esta al cartucho del extractor.
4. Se pone el cartucho en el portadetal de vidrio y se coloca en el compartimento del extractor. En el vaso de borde esmerilado (previamente puesto a peso constante) se agregan 50 ml de éter de petróleo y con ayuda de un anillo metálico con rosca se asegura al aparato de extracción donde se ha colocado el cartucho.

5. Se sube la parrilla hasta que esté en contacto con el vaso y se calienta poniendo el control de temperatura de la parrilla en grado bajo, se abre la llave de agua para enfriar los refrigerantes. Es importante mantener el flujo constante durante 8 h. aproximadamente.
6. Después de este tiempo se baja la parrilla de calentamiento, se deja enfriar se quita el vaso y, se sustituye el portadetal por un colector de vidrio, y nuevamente se asegura el vaso al aparato de extracción, se sube la parrilla de calentamiento y se coloca el control en grado alto, para que así se recupere el éter y en el vaso solo quede el extracto etéreo, se suspende el calentamiento.
7. Se quita el vaso y se coloca en la estufa de vacío (60-65 °C), para eliminar el éter, cuando el vaso esté a peso constante la determinación habrá concluido.

Cálculos:

$$\%Grasa = (Pf - Pi) \times 100 / m$$

Pf= peso del vaso con el extracto etéreo en gramos

Pi= peso del vaso a peso constante en gramos

m= peso de la muestra en gramos

## **VI.B ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

### **VI.B.1 Mésofilos aerobios <sup>20,34,35</sup>**

Fundamento:

Cuando se requiere determinar la concentración de microorganismos en una muestra, se emplean medios de cultivo y condiciones que favorezcan su desarrollo, el medio que comúnmente se utiliza es el agar soya-tripticaseína para el método de cuenta en placa.

Material y Medios de cultivo

- Cajas petri de 100 x 15 mm.
- Pipetas graduadas de 10, 5 y 1 ml
- Tubos de ensaye (20 x 150 mm.)

- Asas para siembra
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml
- Mechero
- Campana de flujo laminar VECO
- Autoclave
- Incubadora BLUE-M
- Contador de colonias Quebec
- Agar soya-tripticaseína (Bioxon)
- Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (a)
- Solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2 (b)

#### Preparación de soluciones.

##### a) Solución reguladora de fosfatos pH 7.2.

Disolver en un matraz de 1000 ml, 34 g de fosfato monobásico en 500 ml de agua destilada: Mezclar y aforar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a  $7.2 \pm 0.1$  agregando sí es necesario una solución 2 N de hidróxido de sodio. Guardarlo en refrigeración.

##### b) Solución diluida de fosfatos pH 7.2.

Diluir 1 ml de la solución concentrada en 800 ml de agua destilada, ajustar a pH  $7.2 \pm 0.1$  envasar y esterilizar en autoclave  $121^\circ \text{C}$  durante 15 minutos.

#### Procedimiento

1. Se pesan 10 g de muestra y se aforan a 90 ml de solución tampón fosfato La muestra deberá diluirse en forma rápida y homogénea, bajo condiciones estériles y colocarse inmediatamente en los medios de cultivo.
2. Colocar 1 ml de cada dilución en cajas petri estériles e inmediatamente, agregar de 20-25 ml del medio de cultivo agar soya-tripticaseína, preparado y esterilizado previamente , y al momento de usarse fundido a  $45^\circ \text{C}$ .
3. Mezclar con movimientos rotatorios y dejar solidificar a temperatura ambiente; una vez solidificado el medio.

4. Incubar en posición invertida durante 2-3 días a una temperatura de 30-35 °C. (cada dilución se siembra por duplicado).

Nota: para asegurar que el diluyente está realmente estéril se recomienda hacer un testigo el cual consiste en colocar 1 ml del diluyente en lugar de muestra.

Seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 30 a 300 colonias, para tener el menor error en el recuento.

Si ninguna de las placas tienen entre 30 y 300 colonias, se utiliza la placa cuyo recuento se aproxime más a esta cifra. Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se cuentan las colonias de dos cajas por cada dilución se toma el valor medio y se multiplica por el factor de dilución el número de unidades formadoras de colonias se indica en relación al peso (g) o la cantidad (ml) del material de ensaye.

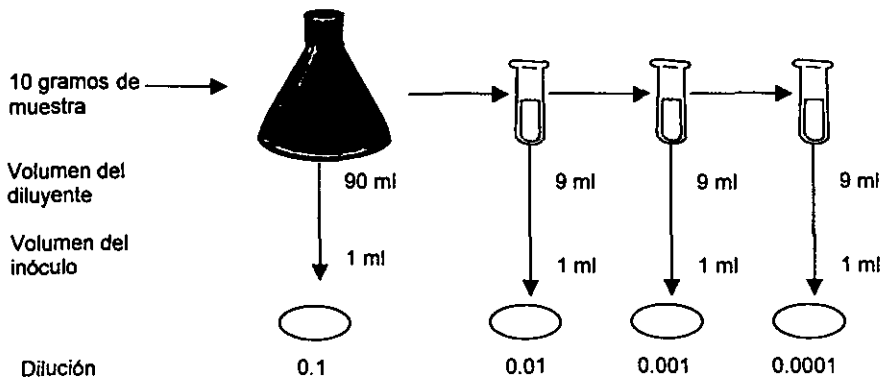
Cálculos.

$$\text{UFC/ml.} = \text{UFC} \times (1 / \text{dilución})$$

Donde:

UFC = Unidades formadoras de colonias

Figura VI.B.1.1 Diagrama para el recuento de microorganismos mesófilos





## **VI.B.2 Coliformes**<sup>20,37,38</sup>

Fundamento.

Estos microorganismos fermentan la lactosa con producción de gas en 48 horas cuando se incuban a 32-35 °C. Por lo anterior, una de las formas de realizar la demostración y recuento de organismos coliformes es mediante el empleo de tubos de fermentación que contengan caldo lactosado y computando su número en base a las tablas del número más probable (NMP).

Material y medios

- Tubos de ensaye (20 x 150 mm.)
- Tubos de Dunham
- Asas para siembra
- Pípetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Mechero
- Campana de flujo laminar VECO
- Autoclave
- Incubadora BLUE- M
- Caldo lauril triptosa LST (Bioxon)
- Caldo lactosa bilis verde brillante LBVB (Bioxon)
- Solución reguladora de fosfatos pH 7.2
- Solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2
- Se preparan los medios de cultivo y las soluciones reguladoras e introducirlos en el autoclave a 121 °C / 15 minutos.

Procedimiento

1. Pesar 10 g de muestra y transferirlos a un matraz que contenga 90 ml de la solución diluyente y homogeneizar. Continuar las diluciones de la muestra hasta la dilución  $10^{-3}$  utilizando pipetas diferentes para cada dilución.
2. Una vez realizadas las diluciones, inocular 1 ml por dilución a cada uno de los tres tubos con 9 ml caldo lauril sulfato triptosa.

3. Incubar los tubos por 48 horas, agitar suavemente los tubos para formación de gas inocular de cada tubo al caldo lactosa bilis verde brillante, incubarlos por  $48 \pm 2$  horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  y hacer la lectura sobre la formación de gas.
4. Se determina el número de microorganismos de acuerdo a la tabla de número más probable (NMP) de microorganismos que aparece al final de esta sección.

Cálculos:

Se reporta el NMP de coliformes por gramo (de acuerdo al cuadro del número más probable de organismos que aparece en la siguiente página en la figura II.C.2.2

Figura II.B.2.1 Recuento de microorganismos por dilución en tubo. Prueba presuntiva

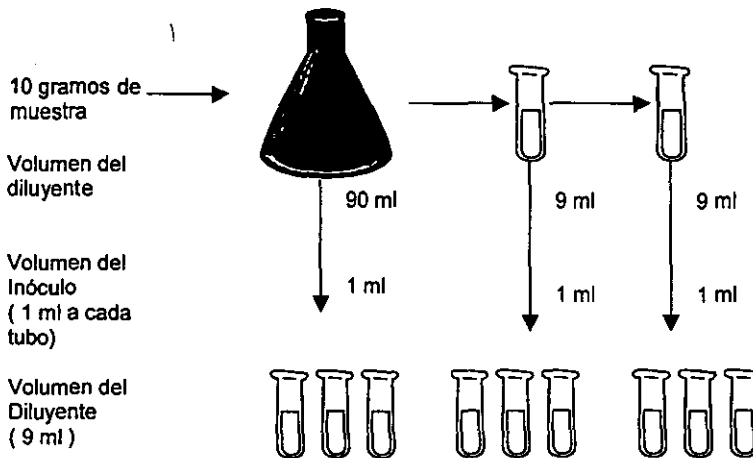


Tabla VI.B.2.2 Número más probable <sup>37</sup>

3 con 1 ml de dilución 1:10 = 0.1 g de muestra

3 con 1 ml de dilución 1:100 = 0.01 g de muestra

3 con 1 ml de dilución 1:1000 = 0.001 g de muestra

Tubos	Positivos	NMP/g		Tubos	Positivos	NMP/g	
3	3	3		3	3	3	
(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)	
0	0	0	-3.0	1	0	0	3.6
0	0	1	3.0	1	0	1	7.2
0	0	2	6.0	1	0	2	11.0
0	0	3	9.0	1	0	3	15.0
0	1	0	3.0	1	1	0	7.3
0	1	1	6.1	1	1	1	11.0
0	1	2	9.2	1	1	2	15.0
0	1	3	12.0	1	1	3	19.0
0	2	0	6.2	1	2	0	11.0
0	2	1	9.3	1	2	1	15.0
0	2	2	12.0	1	2	2	20.0
0	2	3	16.0	1	2	3	24.0
0	3	0	9.4	1	3	0	16.0
0	3	1	13.0	1	3	1	20.0
0	3	2	16.0	1	3	2	24.0
0	3	3	19.0	1	3	3	29.0

Tubos	Positivos	NMP/g		Tubos	Positivos	NMP/g	
3	3	3		3	3	3	
(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)	
2	0	0	9.1	3	0	0	23.0
2	0	1	14.0	3	0	1	39.0
2	0	2	20.0	3	0	2	64.0
2	0	3	26.0	3	0	3	95.0
2	1	0	25.0	3	1	0	43.0
2	1	1	20.0	3	1	1	75.0
2	1	2	27.0	3	1	2	12.0
2	1	3	34.0	3	1	3	160.0
2	2	0	21.0	3	2	0	93.0
2	2	1	28.0	3	2	1	150.0
2	2	2	35.0	3	2	2	210.0
2	2	3	42.0	3	2	3	290.0
2	3	0	29.0	3	3	0	240.0
2	3	1	36.0	3	3	1	460.0
2	3	2	44.0	3	3	2	1100.0
2	3	3	53.0	3	3	3	+1100

### VI.B.3

### Escherichia coli <sup>20,23</sup>

#### Fundamento.

Después de su crecimiento en caldo lactosado, la presencia de *E.coli* se confirma empleando medios de enriquecimiento como son Agar-Mac Conkey y Agar-Levine-Eosine azul de metileno. En el Agar de Mac Conkey la degradación de lactosa a ácido es indicado por el viraje del indicador rojo neutro a rojo oscuro. Debido al contenido de sales biliares, se seleccionan las bacterias intestinales y la flora restante gram (-) se ve inhibida por la violeta cristal. El medio Levine-Eosina es un medio selectivo ya que todos los microorganismos Gram (+) son inhibidos por el contenido de colorantes.

#### Material y medios estériles

- Cajas petri de 1 00 x 15 mm.
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas graduadas de 1,5 y 10 ml
- Asas de siembra
- Mechero
- Campana de flujo laminar VECO Incubadora BLUE-M
- Autoclave
- Caldo lactosado (Bioxon)
- Agar Mac Conkey (Bioxon)
- Agar levine-eosina-azul de metileno (Bioxon)
- Se preparan los medios de cultivo y las soluciones reguladoras e introducir las en el autoclave a 121 ° C / 15 minutos.

#### Procedimiento

Se pesan 10 g de muestra y se colocan en 90 ml de caldo lactosado estéril y se incuban a 30-35 °C 24 horas, hasta que comience el desarrollo. A partir del crecimiento en el medio del caldo lactosado aislar por estría cruzada en agar Mac Conkey e incubar durante 24 h a 35 °C. Colonias de color rojo ladrillo, eventualmente con zonas precipitadas, son características de *E.coli*. Si el cuadro de colonias no es claro, se

siembra sobre agar levine-eosina-azul de metileno y se incuba de 24-48 h a 35 °C. Las colonias de *E.coli* se caracterizan por dar un color negro azulado trasluz y brillo metálico a la luz incidente.

La presencia de *E. coli* puede ser confirmada utilizando las pruebas bioquímicas adecuadas.

#### **VI.B.4. Salmonella** <sup>20,39</sup>

Fundamento.

Los métodos para aislamiento e identificación de Salmonella considera 4 pasos sucesivos:

1. Cultivo en medio de enriquecimiento no selectivos (caldo lactosado).
2. Cultivo en medios de enriquecimiento selectivos (caldo cística-selenito y caldotetrionato).
3. Utilización de medios de enriquecimiento selectivos a base de agar (agar verde brillante, agar xilosa-desoxicolato y agar sulfito de bismuto).
4. Verificación y comprobación de colonias seleccionadas mediante pruebas bioquímicas determinativas.

Material y Medios estériles

- Caja Petri de 100 x 15 mm.
- Tubos de ensaye (20 x 150 mm.)
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Asas para siembra
- Mechero
- Campana de flujo laminar VECO
- Incubadora BLUE-M
- Autoclave
- Caldo lactosado
- Caldo selenito-cística y tetrionato Agar verde-brillante

- Agar xilosa-lisina desoxicolato Agar sulfito-bismuto
- Se preparan los medios de cultivo y las soluciones reguladoras e introducir las en el autoclave a 121 ° C / 15 minutos.

#### Procedimiento

Colocar 10 ml ó 10 g de muestra y 90 ml de caldo lactosado estéril e incubar a 30-35 °C aproximadamente. 24 h. hasta que comience el desarrollo. Si se observa crecimiento, sembrar 1 ml del cultivo en 9 ml de los siguientes medios de enriquecimiento: caldo selenito-cistina y caldo tetrationato, mezclar e incubar de 12-24 h. a 35 °C.

Posteriormente se siembra con ayuda de un asa a los siguientes medios de cultivo selectivos: Agar verde-brillante-rojo de fenol-lactosa-sacarosa -Agar xilosa-lisina-desoxicolato, Agar bismuto-sulfito según Wilson Blair. Los medios de cultivo se incuban 2 días a 35 °C. La colonias sospechosas se pueden confirmar inoculando sobre el medio agar hierro triple azúcar donde se incuban durante 1-2 días. La formación de ácido (coloración amarilla), formación de gas y ennegrecimiento eventual son características del género de Salmonella.

### **VI.B.5 Staphylococcus aureus<sup>20,40</sup>**

#### Fundamento

El agar selectivo para Staphylococcus es Vogel-Johnson es un medio de cultivo para la identificación precoz de Staphylococcus manita-positivos puesto que la capacidad de coagulación del plasma aparece casi siempre simultáneamente con la capacidad de la fermentación de la manita.

Se permite hacer una estimación de su contenido debido a su tolerancia a concentraciones elevadas de cloruro de sodio y su poca sensibilidad frente a los agentes bacteriostáticos cloruro de litio y telurito.

### Material y Medios estériles

- Cajas petri de 100 x 15 mm.
- Tubos de ensaye (20 x 150 mm.)
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Mechero
- Campana de flujo laminar VECO
- Incubadora BLUE-M
- Autoclave
- Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 Solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2 Caldo soya tripticaseína (Bioxon)
- Medio de Vogel-Johnson (Bioxon)
- Se preparan los medios de cultivo y las soluciones reguladoras e introducirlas en el autoclave a 121 ° C / 15 minutos.

### Procedimiento

Pesar 10 g de la muestra en polvo y colocarlo en 90 ml de la solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2. Colocar 1 ml de cada dilución (hasta  $10^{-4}$ ) de la muestra en tubos que contengan 4.5 ml de caldo soya tripticaseína, incubar a 35 °C durante  $48 \pm 3$  horas.

Inocular por estría de los tubos con desarrollo a placas de Vogel-Johnson de manera que se puedan obtener colonias aisladas. Incubar a 35°C durante  $48 \pm 3$  horas.

Observar si existe crecimiento de colonias negras (reductoras de telurito), convexas y brillantes. realizar la prueba de la coagulasa en caso de tener crecimiento de colonias características .

## VI.B.6

## Hongos y levaduras <sup>20,36</sup>

### Fundamento

Para la determinación y cuenta total de hongos y levaduras se utiliza el medio agar papa-dextrosa, el cual es acidificado con ácido tartárico para inhibir el crecimiento bacteriano.

### Material y medios estériles

- Cajas petri de 100 x 15 mm.
- Tubos de ensaye (20 x 150 mm.)
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Mechero
- Campana de flujo laminar VECO
- Incubadora BLUE-M
- Autoclave
- Solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2
- Agar papa-dextrosa (Bioxon)
- Se preparan los medios de cultivo y las soluciones reguladoras e introducir las en el autoclave a 121 ° C / 15 minutos.

### Procedimiento

Pesar 10 g de la muestra y transferirlos a un matraz Erlenmeyer que contenga 90 ml de la solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2, realizar las diferentes diluciones como se ha indicado en la cuenta total de mesófilos aerobios, colocar 1 ml de cada dilución por duplicado en cajas estériles y agregar de 12-15 ml de agar papa dextrosa fundido a 45-48 °C y acidificado con una solución de ácido tartárico al 10%.

Homogeneizar y dejar solidificar. Invertir las cajas petri e incubar una serie de cada dilución a 22 °C durante 5 días para la cuenta de hongos, la otra serie incubarla a 35 °C durante 48 h. para la cuenta de levaduras.



Cálculos:

$$\text{UFC/ml} = \text{UFC} \times (1/\text{Dilución})$$

Donde

UFC= Unidades formadoras de colonias

Contar las colonias de hongos y levaduras, multiplicar por la inversa de la dilución. Reportar: cuenta de hongos en placas de agar papa-dextrosa después de 5 días a 22 °C por gramo de muestra y cuenta de levaduras en placas de agar papa-dextrosa después de 48 h. a 35 °C.

## **VI.C DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS**

### **VI.C.1 Determinación de aminoácidos por autoanalizador con columna de intercambio iónico<sup>30,54</sup>**

Fundamento

Para la determinación de los aminoácidos de una muestra proteínica es indispensable someter a una hidrólisis con HCl 6 N, en una cantidad de 2.5 a 5000 veces su peso molecular de la proteína. Este método sirve para identificar los aminoácidos de forma directa por medio de una columna de intercambio iónico a una temperatura controlada, pasando estos compuestos retenidos en la columna por un momento, a la fase de detección y cuantificación colorimétrica, tomando como patrón interno la norleucina.

Material y reactivos

- Autoanalizador de aminoácidos Technicon, Mod NC-2P
- Digestor Tecator, mod ab 20/40
- Potenciómetro Corning, mod 10

- Rotavapor Buchi, mod. R
- Vortex Lab Line Instruments, mod. Super-mixer No 1290
- Adaptador para filtración en jeringa Millipore XX30-012-00
- Membrana Millipore tipo HATF – 02500 ( 0.45  $\mu$ M)
- Microjeringa marca Hamilton, mod. 1001- LTN
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y teflón Pyrex 9826
- Acido clorhídrico 6 N
- Metil – Celosolve al 50 %
- Solución reguladora de pH de acetato de sodio 4.0 N
- Sulfato de hidracina
- Ninhidrina
- Solución lavadora
- Solución reguladora de pH de dilución
- Soluciones reguladoras de pH de acetatos para regeneración y elución
- Hidróxido de sodio 0.1 N

#### Preparación de Soluciones

⇒ Solución reguladora de pH de acetato de sodio 4.0 N.

Colocar 3 litros de agua desionizada en un dispositivo de agitación, adicionar lentamente 1.312 Kg de acetato de sodio anhidro, una vez fría la solución añadir 400 ml de ácido acético glacial lentamente, dejar enfriar y aforar a 4 litros. Finalmente se ajusta el pH a  $5.51 \pm 0.02$

⇒ Sulfato de hidracina

Poner en aproximadamente 1 litro de agua desionizada 1.049 g de sulfato de hidracina, a continuación se adicionan 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado y 30 ml de solución BRIJ – 35 al 20 % , se lleva esta solución a un volumen de 4 litros, adicionando como conservador 0.8 ml de ácido caprílico.

⇒ Ninhidrina

Disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de metil – celosolve, a continuación adicionar lentamente 1 litro de la solución reguladora de pH de acetato de sodio 4.0 N. Por último llevar a un volumen de 4 litros

- ⇒ Solución lavadora  
Se preparan 2 litros de agua - etanol ( 3:1 v/v ) con hidroquinona al 0.01 % como antioxidante.
- ⇒ Solución reguladora de pH de dilución  
Se prepara una solución de ácido clorhídrico al 0.2 N (a) y una solución de cloruro de sodio 0.2 M (11.69 g/l) (b). Se mezclan 50 ml de (a) y 33.3 ml de (b) se afora a 200 ml con agua des-ionizada. Adicionar hidroquinona al 0.01 % y ajustar el pH a  $1.50 \pm 0.05$ .
- ⇒ Solución reguladora de pH para la corrida del hidrolizado ácido de la proteína en estudio. Columna 470 mm \* 5 mm.

Figura VI.C.1 Preparación de soluciones reguladoras de pH para el autoanalizador

Reactivos (grado analítico)	Regulador de pH 1 Regeneración de Resina	Regulador de pH 2 Elución de ácidos y Neutros	Regulador de pH 3 Elución de am. básicos	NaOH 0.2 N lavado de resina
Acetato de Sodio	4.1 g	5.0 g	87.0 g	
Acido acético glacial	20.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	
Sol. Acetato de zinc		0.6 ml		
Alcohol etílico absoluto	78.0 ml	78.0 ml		
Alcohol benzílico			11.0 ml	
Hidroquinona	0.11 g	0.11 g		
Sol. Brij35 al 20 %	8.0 ml	8.0 ml	8.0 ml	
Merck # 1962				
EDTA (disódica)	0.1 g			0.1 g
Hidróxido de sodio				8.0 g

Acido caprílico	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Agua desionizada	1.0 l	1.0 l	1.0 l	1.0 l
pH escala expandida	4.00 ± 0.02	4.10 ± 0.02	5.30 ± 0.02	
[ Na <sup>+</sup> ] Molar	0.05 M	0.06 M	1.06 M	0.20 M
[ Zn <sup>++</sup> ] Molar	0.00 M	3.0 × 10 <sup>-4</sup> M	1.0 × 10 <sup>-4</sup> M	0.00M

Todos los buffer deben estar filtrados y ajustados en el pH, cabe resaltar que el ácido caprílico se adiciona al último y su uso es evitar el desarrollo de microorganismos.

### Procedimiento

Se pesa dentro del tubo de hidrólisis la cantidad de muestra finamente molida y desengrasada (A), adicionando con mucho cuidado la cantidad de ácido requerida (B). Se procede a congelar el material de hidrólisis en un baño de hielo seco – acetona, una vez congelado se le insufla nitrógeno de altísima pureza y se procede a cerrar perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. Una vez descongelado el material se somete a hidrólisis en el digestor a  $145 \pm 1$  ° C durante 4 horas.

A = (0.05 X 100 ) / % de proteína = cantidad de muestra en gramos

B = (4 X 100 ) / % de proteína = ml de HCl 6 N

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se enfría el tubo y se trasvasa cuantitativamente a un matraz de bola de 100 ml, dándole algunas lavadas con agua caliente y solución lavadora. Después el matraz de bola se coloca en el rotavapor llevando dos veces a sequedad con el fin de eliminar la acidez residual; a continuación se concentra el hidrolizado a un volumen menor a 25 ml.

El hidrolizado concentrado se filtra a través de papel filtro (whatman duro y poro cerrado) sobre el buchner y kitasato con vacío; es conveniente dar un lavado de 5 ml con la solución lavadora, enjuagando el matraz de bola y filtrado a través del papel filtro. El hidrolizado filtrado se le ajusta el pH a  $6.8 \pm 0.2$  en un volumen cercano a los

20 ml, después se afora el hidrolizado a un volumen de 25 ml, si el pH varia ajustar de nuevo el volumen, tomándolo en cuenta para cálculos posteriores.

Para inyectar el anterior hidrolizado en el autoanalizador, se requiere diluirlo con el amortiguador de dilución, en una proporción de 1:1, de la dilución obtenida ( 2 ml ), se procede a filtrar una parte a través del dispositivo Millipore, para lo cual se descartan las primeras gotas y el resto se utiliza para inyectar 100 µl.

Las condiciones físicas se mencionan a continuación para el uso del equipo autoanalizador.

Tamaño de columna	470 * 4 mm
Altura empacada de la columna	420 ± 5
Temperatura de la columna	60 °C
Velocidad de flujo de los amortiguadores	0.6 ml / min.
Velocidad de flujo de la ninhidrina	0.8 ml /min.
Velocidad de flujo de sulfato de hidracina	0.6 ml / min.
Velocidad de flujo de nitrógeno	0.32 ml / min.
Velocidad de flujo sobre el colorímetro	0.6 ml / min.
Temperatura del baño de reacción	89 ° C
Sensibilidad del registrador	2.5 U
Velocidad de la carta	3.0 mm / min.

#### Programa

Paso	Tiempo (min.)	Caracterización
1	2	Amortiguador # 1; Metil-celosolve; inyección
2	6	Amortiguador # 2; Metil-celosolve
3	90	Amortiguador # 2; Ninhidrina; registrador
4	160	Amortiguador # 3; Ninhidrina; registrador
5	16	NaOH 0.2 N; Ninhidrina; registrador
6	2	NaOH 0.2 N; Metil-celosolve; registrador

7	6	Amortiguador # 1; Metil-celolve; registrador
8	10	Amortiguador # 1; Metil-celolve apagado del registrador
9	16	NaOH 0.2 N; Metil-celolve
10	46	Amortiguador # 1; Metil-celolve

### Cálculos

Previamente se corre una solución estándar de aminoácidos que contenga 0.25  $\mu\text{M}$  de cada uno de los aminoácidos con las condiciones mencionadas. Además tanto el hidrolizado como el patrón de aminoácidos se deben inyectar con los mismos volúmenes teniendo como patrón interno el aminoácido sintético de norleucina, para poder realizar los cálculos en base a los llamados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos (la norleucina se agrega después de la hidrólisis de 25 – 50  $\mu\text{l}$ ).

$$EN_{aa} = AN_{std} / AA_{std}$$

En donde :

$EN_{aa}$  = Equivalente de norleucina del aminoácido correspondiente.

$AN_{std}$  = Area de norleucina del estándar.

$AA_{std}$  = Area del aminoácido correspondiente en el estándar.

Del aminograma obtenido se calculan las áreas bajo las curvas de todos los aminoácidos incluyendo la norleucina, para lo anterior es conveniente trabajar con la mitad superior de cada uno de los picos, los cálculos que se deben realizar para cada uno de los aminoácidos que salen en sus respectivos tiempos de retención son los siguientes:

$$A_{aa} = B_{aa} \times h_{aa}$$

$$\text{mg a.a. / g Nitrógeno} = (A_{aa} * EN_{aa} * \mu\text{M}_{std} * PM_{aa} * A) / (AN_m * a * MGN_m)$$

En donde:

$A_{aa}$  = Area del aminoácido en el aminograma de la muestra

$B_{aa}$  = Base a la mitad del pico

$h_{aa}$  = Altura del pico desde la línea base

EN <sub>aa</sub> =	Equivalente de norleucina del aminoácido correspondiente
μM <sub>aa</sub> =	Micromoles del aminoácido en el estándar
PM <sub>aa</sub> =	Peso molecular del aminoácido
A =	Aforo al que se llevo el hidrolizado (en ml)
AN <sub>m</sub> =	Area de la norleucina en el aminograma de la muestra
a =	Alícuota inyectada
MGN <sub>m</sub> =	Miligramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada

Los aminoácidos que se determinan en la siguiente secuenciación por este método son los siguientes : ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, serina, prolina, cisteína, alanina+glicina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina y arginina.

#### **VI.C.2 Determinación colorimétrica de triptofano <sup>23,29</sup>**

De todos los aminoácidos de las proteínas, solamente el triptofano y la tirosina muestran fluorescencia en medios acuosos; la intensidad de fluorescencia del triptofano es grande a un pH cercano a 11 y a una longitud de onda de 590 nm. Para lo cual previamente se tiene que realizar una hidrólisis con hidróxido de litio.

##### **Material**

- Digestor Tecator Mod. AB 20/40
- Potenciómetro Corning. Mod. 10
- Rotavapor Buschi. Mod R
- Vortex Labline Instruments. Mod Super mixer # 1290
- Tubos de cultivo con tapón de rosca y cubierta de teflón Pyrex No.9826
- Hidróxido de Litio 4 N
- Acido orto.fosfórico concentrado (85 %)
- Nitrito de sodio 0.2 %
- Solución lavadora Agua - etanol ( 3:1 v/v) con hidroquinona al 0.01 %
- Espectrofotómetro o colorímetro en espectro visible
- Celdas de 1cm

- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Balanza analítica
- Acido clorhídrico concentrado
- Solución de Triptofano 50 µg/ml
- Solución de p-dimetil-amino-benzaldehído al 0.5 % en HCl 12 N

**Procedimiento:**

1. Pesar una cantidad determinada de muestra desengrasada (A'') en un tubo de hidrólisis, adicionando con mucho cuidado el hidróxido de litio (B'')

$A'' = (0.1 \times 100) / \% \text{ de proteína} = \text{cantidad de muestra en gramos}$

$B'' = (4 \times 100) / \% \text{ de proteína} = \text{ml de álcali}$

2. Insuflar nitrógeno y cerrar los tubos en la campana y con mucha precaución.
3. Colocar los tubos en el digestor a  $145 \pm 1$  °C, durante un tiempo determinado

Contenido de proteína	Tiempo de Hidrólisis
9 – 35 %	8 horas
36-64 %	6 horas
65-91 %	4 horas

4. Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar el tubo y se transvasa cuantitativamente el contenido a un vaso de precipitados, lavándose el tubo con agua caliente y solución lavadora.
5. Se ajusta el pH a neutralidad con ácido ortofosfórico concentrado empleando el potenciómetro (no más de 50 ml) .
6. Se filtra con vacío con papel Whatman No. 2.
7. Se toman alícuotas de 2 ml de cada uno de los hidrolizados y uno como blanco; adicionar a los tubos 7.5 ml de DMAB, se agitan y se dejan en reposo 15 min. En la obscuridad.
8. Una vez transcurrido el tiempo se les adiciona 0.5 ml de nitrito de sodio, se agita y nuevamente se deja 15 minutos en la obscuridad



9. Transcurrido el tiempo de formación de color leer a 590 nm. (filtro verde), usando el tubo blanco para ajustar el espectrofotómetro.
10. Preparación de curva patrón: Prepara una solución de triptofano de 50 - 100 µg/ml tomando alicuotas de 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 .... 2.0 ml de la solución estandar y aforar a 2 ml con agua des- ionizada. Leer a 590 nm. Correr simultáneamente un blanco.
11. Se gráfica una curva estándar % T Vs. Ug triptófano /ml, interpolando los valores obtenidos tomando en cuenta la cantidad de muestra original, % de proteína, el valor interpolado y los volúmenes finales de dilución.

## **VI.D PRUEBAS BIOLÓGICAS**

### **VI.D.1 Razón de eficiencia proteínica <sup>3,29,53</sup>**

Llamada también índice de eficiencia proteica (REP), es definido como la ganancia en peso dividida entre el peso de proteína consumida.

El método está basado exclusivamente en la ganancia de peso y no considera ni la composición corporal ni los requerimientos de proteína para su mantenimiento.

Chapman en 1959 estandarizaron un método de REP <sup>55</sup> en términos de edad y sexo de los animales, nivel de proteína; composición de la dieta y duración del período de alimentación. Estos autores también introdujeron el concepto de expresar el REP relativo a un valor de 2.50 asignado a la caseína. Los métodos oficiales descritos para la determinación de REP utilizan ese valor de 2.50 para la caseína.

Material :

- Balanza granataria ( $\pm 0.1$  g)
- Balanza para pesar animales de laboratorio ( $\pm 0.1$  g)
- Mortero con pistilo
- Recipientes o bolsas herméticas
- Mezcladora
- Cernidores de 0.1- 0.5 cm de diámetro

- Comedero para rata
- Bebedero para el tipo de jaula
- Caseína ANRC (Milk products 94975 – 8016)
- Aceite de semilla de algodón
- Mezcla de sales USP
- Mezcla de vitaminas (AOAC 1990)
- Celulosa
- Fuente de proteína (pollo seco y deshidratado)

Procedimiento:

1. Seleccionar ratas machos de una misma colonia de un bioterio conocido de 21-28 días de edad, sanas y con un peso entre 40 y 60 gramos el período de aclimatación es de 2-4 días durante el cual se alimenta a los animales con una dieta comercial adecuada.( Trabajo de Bioterio)
2. De las ratas seleccionadas, clasificarlas de acuerdo a su peso y distribuir las uniformemente en grupos, esperando que cada grupo que corresponde a un lote de alimento tenga ratas de peso similar a las de los otros lotes (Técnica empírica de serpiente).
3. Preparar una dieta de la proteína a evaluar y la proteína de referencia tomando en cuenta los siguientes parámetros para conocer la cantidad que se tiene que utilizar de cada uno de los ingredientes. (cabe resaltar, que los ajustes de la dieta se hacen para la proteína de estudio y la de la referencia, conociendo previamente su análisis proximal).

Muestra:  $X^*$

Aceite de Semilla de algodón =  $8 - [(X^* \times \% \text{ de grasa}) / 100]$

Mezcla de sales USP =  $5 - [(X^* \times \% \text{ de cenizas}) / 100]$

Mezcla de Vitaminas = 1

Celulosa =  $1 - [(X^* \times \% \text{ de fibra cruda}) / 100]$

Agua =  $5 - [(X^* \times \% \text{ de humedad}) / 100]$

Azúcar o almidón de maíz = Ajuste a 100 g

$X^* = (1.60 \times 100) / \% \text{ de Nitrógeno de la muestra o del patrón de referencia}$

4. Se mezclan los ingredientes que anteriormente se ha calculado, mezclando hasta el último las vitaminas. Se recomienda empezar mezclando en dos lotes de acuerdo a la cantidad que se utilice. Refrigerar las dietas en recipientes con cierre hermético
5. Los animales se alojan en jaulas individuales de acero inoxidable (33x20x18 cm) con piso de malla. El ciclo de luz debe ser de 12 h. temperatura ambiente.
6. Después del período de aclimatación los animales deben ser divididos en grupos por pesos y distribuidos al azar en los diferentes tratamientos que se pretende realizar, cuidando que los grupos de animales en cada tratamiento sean semejantes en peso.
7. Alimentar a las ratas con las dietas preparadas de control y de estudio, registrar la cantidad de alimento al principio y cada que se pesen las ratas, anotar la cantidad de alimento ingerido y reponerlo dejando un pequeño exceso de alimento (no mas de 10 g) registrando al final la cantidad de alimento final
8. Recolectar heces a partir de la penúltima semana de estudio, para lo cual se utilizaran frascos limpios para la recolección y secado de las heces de cada rata.
9. Los animales deben pesarse al inicio y cada dos días durante los 21 días de la prueba en una balanza que tenga una sensibilidad de 0.1 g.
10. Si se sospecha de selección del alimento por los animales hay que determinar el nitrógeno a los residuos para compararlo y evitarlo ya sea moliendo más la dieta o humedeciendo e incluso pastillando el alimento.

11. Los registros que se deben llenar desde el principio son los siguientes:

Rata: \_\_\_\_\_ Peso Inicial (Pi)  
 \_\_\_\_\_ Dieta: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Tiempo (días)	0  2  5  7  9  12  14  16  19  21	Total
Peso del Animal		Pf =
Incremento Acumulativo		Pf = Pi
Alimento Inicial ( Ai )		
Alimento Fina ( Af )		
Alimento Ingerido ( AI = Ai - Af )		Σ AI =
Alimento Acumulativo		

Cálculos

$P = (\text{incremento acumulativo en gramos}) / \text{proteína ingerida en gramos}$

$$= (Pi - Pf) / (\Sigma AI \times F)$$

En donde

Pi = Peso inicial

Pf = Peso final

Pi - Pf = Incremento acumulativo

Σ AI = Cantidad total de alimento ingerido

F = Factor del contenido de proteína expresado en fracción decimal

(0.1 = 10 %)

Con cada uno de los valores individuales, se procede a calcular el REP promedio del lote de estudio. El coeficiente de variabilidad de los lotes individuales no debe ser mayor de 10.

$$REP = \frac{\sum_{i=1}^n REPi}{n}$$

$$\text{Coeficiente de Variabilidad} = \sigma / x * 100$$

Una vez realizados los cálculos anteriores se ajustan los resultados de REP promedio con el de referencia que es la caseína.

$$\text{REP ajustado} = \text{REP prueba} * \frac{\text{REP caseína (ref.)}}{\text{REP caseína (exp)}}$$

Donde REP (ref) = 2.5

### **VI.D.2 Digestibilidad aparente. <sup>57</sup>**

Este procedimiento comprende la determinación del nitrógeno en heces cuando una cantidad conocida de la proteína en prueba es la única fuente de nitrógeno ingerido.

Procedimiento:

1. De las muestras que se recolectaron de las ratas en estudio para la prueba de REP, a partir de la penúltima semana de estudio, se limpian bien eliminado cualquier materia ajena como alimento aserrín y pelaje.
2. Cuando acabe la prueba de REP las heces se secan en una estufa de aire a una temperatura de 50 - 60 °C, durante 4 – 8 horas, terminado este periodo se homogeneizan bien las heces de cada rata en un mortero.
3. Se toma de 100 a 300 mg de muestra y se determina nitrógeno (VI.A.3)
4. Se toman muestras de las dietas y también se les determina el nitrógeno por el método anterior (VI.A.3)

Cálculos:

$$\% \text{ Digestibilidad Aparente} = \frac{\text{Nitrógeno ingerido} - \text{Nitrógeno fecal} \times 100}{\text{Nitrógeno ingerido}}$$

## **VI.E ANALISIS FÍSICOS.**

### **VI.E.1 Densidad aparente <sup>23</sup>**

Fundamento:

Es una propiedad importante desde el punto de vista económico, comercial y funcional, se define como el peso de un volumen dado del polvo y expresado en g/ml, g/100 ml y g/l .

Material

- Probeta de vidrio de 100 ml.
- Soporte universal
- Anillo metálico
- Placa de unicel de 15 x 15 cm
- Papel parafilm
- Balanza analítica

Procedimiento :

1. Pesar la probeta limpia y seca, registrar el peso.
2. Con la muestra en polvo llenar la probeta hasta graduación 100 ml., se tapa la boca de la probeta con papel parafilm.
3. La probeta con la muestra se deja caer 20 veces a través del anillo metálico a una altura de 10 cm sobre la placa de unicel.
4. Se mide el volumen desplazado de la muestra en la probeta, se pesa la probeta después del proceso anterior.
5. Posteriormente se mide el volumen alcanzado por el polvo y se pesa.

Cálculos

$$P = m / v$$

Donde:

P= densidad

m= masa = pf - pi

v= volumen

pf= peso final

pi= peso inicial

## **VI.E.2 Pruebas de Reconstitución <sup>23</sup>**

Se les determinó a los polvos seleccionados las pruebas de reconstitución que se aplican a polvos instantáneos.

↔ Volumen de Sedimentación

↔ Solubilidad

### **VI.E.2.1 Volumen de Sedimentación <sup>23</sup>**

Fundamento:

El volumen de sedimentación es la relación entre el volumen de equilibrio y el volumen total de la suspensión

Material:

- Balanza analítica
- Probeta de 100 ml
- Papel parafilm

Procedimiento:

1. Se pesan 10 g de muestra y se colocan en una probeta de 100 ml.
2. Se afora con agua a 100 ml. y se tapa con papel parafilm.
3. Se agita cada 2 h. tomando cada vez la lectura, repitiendo esta operación hasta que transcurra 24 h. El volumen de sedimentación final será el promedio de las lecturas tomadas en 24 h.

Cálculos:

$$\text{V. De Sedimentación} = \frac{\text{V. De Sedimentación final}}{\text{V. De Sedimentación inicial}}$$

Donde: Volumen de sedimentación final = 100 ml

Lo ideal es que el volumen de sedimentación sea 1.

## **VI.E.2.2 Solubilidad** <sup>23,25</sup>

Fundamento:

La determinación del valor de solubilidad es fundamentalmente empírica y depende de factores como el método de secado, la temperatura de secado y acidez. Por lo anterior los resultados tienden a ser comparativo.

Material

- Centrifuga DYNAC
- Estufa de vacío marca LAB-LINE Mod.3620
- Balanza analítica
- Charolas de aluminio

Procedimiento

1. Se pesan 4 g de muestra, se transfieren a un tubo de centrifuga de 50 ml, se agregan 32 ml de agua a 50 °C, se agita el tubo durante 10 segundos y se coloca en un baño de agua a 50 °C durante 5 minutos.
2. Se centrifuga la suspensión a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, se deja enfriar en el refrigerador durante 2 h, posteriormente se retira la capa de grasa formada en la superficie, y una vez que esté a temperatura ambiente, el tubo se agita vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Se transfieren 2 ml de esta suspensión a una charola previamente puesta a peso constante y se pesa.
4. Se evapora a sequedad en la estufa de aire forzado y posteriormente, se transfieren a una estufa de vacío hasta peso constante.
5. La suspensión que se encuentra en el tubo se vuelve a centrifugar a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, se transfieren 2 ml del líquido sobrenadante a una charola puesta previamente a peso constante y se pesa.
6. Se evapora a sequedad y se seca a 100 °C hasta peso constante.



Cálculos

$$\% \text{ Solubilidad} = 100 * (T1 * S2) / (T2 * S1)$$

T1= Peso de la suspensión tomada para la determinación de sólidos totales después de la primera centrifugación.

T2= Peso de la suspensión para la determinación de sólidos totales después de la segunda centrifugación.

S1 = Peso de los sólidos totales correspondientes a T1.

S2= Peso de los sólidos totales correspondientes a T2.

### **VI.E.3 PRUEBAS REOLÓGICAS <sup>23,47</sup>**

Estas pruebas se realizaron a los polvos seleccionados de acuerdo a las técnicas establecidas para polvos instantáneos y las determinaciones son las siguientes:

- **Angulo de reposo**
- **Velocidad de flujo**

#### **VI.E.3.1 Angulo de reposo <sup>23,47</sup>**

Fundamento :

El ángulo de reposo es una medida relativa de la fricción de las partículas de polvo y es una medida que forma la superficie lateral del cono con la horizontal.

Material.

- Embudo de lámina o de plástico liso de 1.5 cm de diámetro
- Soporte universal
- Base sólida marcada con diferentes radios conocidos

Procedimiento.

1. Se pesan 10 gramos de muestra en polvo y se hacen pasar a través del embudo a una altura de 10 cm, para formar una pila sobre una superficie de papel. Una vez formada ésta, se mide su altura y su radio.

Cálculos:

$$\text{Tang} = h / r \quad \text{Angulo de reposo} = \text{tang}^{-1}$$

Donde:

h= altura dei cono de polvo

r= radio

### **VI.E.3.2 Velocidad de flujo <sup>23,47</sup>**

Fundamento:

La velocidad de flujo permite saber que tan fácil fluye en polvo, considerándose el tiempo que tarda en pasar una cierta cantidad de polvo a través de un embudo de flujo.

Material:

- Embudo de lámina o de plástico liso de 1.5 cm de diámetro
- Soporte Universal
- Base sólida
- Cronómetro

Procedimiento

1. Se pesan 10 gramos de muestra, se hacen pasar por el embudo y se mide el tiempo que tarda en caer.

Cálculos:

$$\text{Velocidad de Flujo} = m / t$$

Donde:

m= peso de la muestra (g)

t= tiempo (segundos)

## VII Bibliografía

- 1 ADAMS, R.F., VANDERMARK, F.L. Y SCHIMIDT, G.T. 1977." Ultra micro G.C. determination of amino acids using glass open tubular columns and a nitrogen selective detector". *Journal Chromatographic Science*. 15(1).pp 63
- 2 ALBANESE Y ORTO. 1973., "The protein and aminoacids. in Goodhart and Shils". M.E. Modern nutrition in health and disease. Fifth Ed. Leg and Fehiger. Philadelphia Ed.. Worth. Publishers. Inc.
- 3 A.O.A.C., 1990., Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, 14 th Ed. pp.17-18,40-62,63-83,1012,1095-1098.
- 4 ARAYA, VERA, RUZ Y PAK. 1989 "Índice de calidad nutricional por volumen (ICNV).Un nuevo indicador para evaluar la calidad nutricional de preparaciones de dietas". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 39(1). pp.20-25
- 5 ARAYA, ALVIÑA, VERA Y PAK 1991 "Valores recomendables de densidad energética en preparaciones de consistencia tipo sopa o crema espesa,destinadas a la alimentación del preescolar". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 41(1). pp. 54-58
- 6 ARAYA, ALVIÑA, VERA, SOLA, DIAZ Y PAK. 1995 "Efecto de precargas proteicas de hidratos de carbono sobre el consumo de alimentos y energía en preescolares con diferente estado nutricional". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.45 (1). Pp.25-29
- 7 ARMADA Y JIMENEZ.1996 "Desarrollo de un alimento suplementicio para grupos vulnerables". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 46(4). pp. 304-308
- 8 BANGUELA, PAZ, FERNADEZ, VALDEZ Y MARTINEZ. 1996 "Alimento completo para niños intolerantes a la lactosa". *Alimentaria*. Diciembre. pp. 110-112.
- 9 BENDER, E.A. AND DOELL, B.H., 1957." Note on the determination of net protein utilization by carcas analysis". *Britanic Journal of Nutritions*. (11) pp.138.
- 10 BROWN K.H. 1992. "The dietary managment of acute childhood diarrhea:optimal timing of feeding an apropiateuse of local mixed diets". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 42(3). pp. 45-47.
- 11 CABRERA, REAL, ORTEGA, ESPINOSA Y MARTINEZ . 1996. "Producto en polvo con fines terapeúticos". *Alimentaria*. Junio. pp76-79.
- 12 CARPENTER, K.J., 1973. "Damage to lysine in food processing: Its measurement and its significance". *Nutrition Abstracts*. (43). pp.423-451.
- 13 CORNEJO, HERNANDEZ Y SOTELO. 1993 "Nutritive value of chicken and corn flour mixtures in formulas for infants with lactose intolerance". *Cereal Chemistry*. September - October. 70 (5) pp 572-574
- 14 CHEFTEL, J.C., 1977. "Chemical and nutritional modifications of food proteins due to processing and storage, in food proteins". AVI publishing Co., Westport, Conn., pp. 401-445
- 15 EGGUM, B. O., 1973. "A study of certain factores influencing protein utilization in rats and pigs". Publ. 406. National Institute of Animal Science Copenhagen.
- 16 ENSMINGER, A., ENSMINGER, M., KOLANDS, J., ROBSON, J., 1994. *Foods Nutrition Encyclopedia*. 2ª Ed. Vol. 2. CRC Preess. Inc.

- 17 FAO., 1991. Citado por Kazuo, en 1985. "Food and nutrition Bulletin of dietary essential amino acid relative to the 1989 FAO/WHO. Protein scoring pattern". United Nations University Press. 16(2). pp.106 y 107.
- 18 FAO/WHO, 1973."Energy and Protein Requirements". Food and Agriculture Organization Nurt. Rep. Ser. No 52; World Health Organization Techn. Ser. No. 52.
- 19 FAO/WHO/UNU. Joint Expert Consultation 1985."Energy and Protein Requerimets". World Health Organization Techn. Rep. Ser. No. 724.
- 20 FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 1989. Quinta edición México pp 201- 209
- 21 FENNEMA, O.R.,1993."Química de los alimentos". Ed. Acribia S.A, España. pp. 358 – 407.
- 22 GARCIA, B.,SOTELO, L.,SOUSA, S. 1990. "Método simplificado para cuantificar grasa en leche y crema". Revista de la Sociedad Química de México. 34(1). pp 39-41.
- 23 GOMEZ, Z.Y, 1998 "Optimización del proceso de secado por aspersión y control de calidad de formulas en polvo de pollo-arroz y pollo-harina de maiz nixtamalizado para niños intolerantes a la lactosa". Tesis Facultad de Química. UNAM (En proceso).
- 24 GONZALEZ, R., CARRILLO D., LEE, M., LEDESMA, L., FERNÁNDEZ,S.,1987. "Nutrición Humana". Ed. Pueblo y Educación, Cuba. pp. 23-50.
- 25 HARD, E., RENALD, S., KIRK, R., 1988 " Análisis químico de alimentos de Pearson". Edit. Continental S.A de C.V. México. Pp. 25 – 26
- 26 HEGSTED, D.M. AND MAND CHANG, H., 1965. "Protein utilization in growing rats. Irelative growth index as a bioassay procedure". Journal of Nutrition. (85) pp159.
- 27 HERNANDEZ, T.,HERNANDEZ, A. Y MARTINEZ 1996." Calidad de proteínas. Conceptos y evaluación". Alimentaria. Julio – Agosto. pp 27-36
- 28 LEHNINGER, A.L., 1975. "Principles of Biochemistry". Worth Publishing, New York. Pp.76-97.
- 29 LUCAS, F., ARTEAGA, E., 1982 "Prácticas de laboratorio de Nutrición". Departamento de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México DF
- 30 LUCAS, F., SOTELO, L.,1982 "Amino acid detemination in pure proteins, foods, and feeds using two different acid hydrolisis methods" Analytical. Biochemistry. (123) pp 349-356
- 31 MITCHELL, H.H., 1924. "A new method of determination of the biological value of protein". Journal of Biological Chemistry. (58). pp.873.
- 32 MULLER, T., AND TUBIN, G., 1986. "Nutrición y Ciencia de los Alimentos". Ed. Acribia. España. pp. 112-127.
- 33 NORMA DEL IMSS. 1990. " fórmula no láctea en polvo" México
- 34 NOM-092-SSA1-1994."Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa".
- 35 NOM-110-SSA1-1994."Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico".
- 36 NOM-111-SSA1-1994."Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos".
- 37 NOM-112-SSA1-1994."Determinación de bacterias coliformes.Técnica del número más probable".

- 38 NOM-113-SSA1-1994."Método para la cuenta de microorganismos coliformes en placa".
- 39 NOM-114-SSA1-1994."Método para la determinación de Salmonella en alimentos".
- 40 NOM-115-SSA1-1994."Método para la determinación de staphylococcus aureus en alimentos".
- 41 NUESTRO ACONTECER AVÍCOLA .1997."La producción de pollo en México". Ediciones Pecuarias de México S.A. de C.V. Ene-Feb. 5.(22). pp. 3-22.
- 42 NUESTRO ACONTECER AVÍCOLA .1997."La producción mundial de pollo". Ediciones Pecuarias de México S.A. de C.V. Ene-Feb. 5(22). pp. 23-32.
- 43 PELLET, L.P. AND YOUNG, V.R., 1980."Nutritional evaluation of protein foods". Report of a working group sponsored by the International Union of Nutritional Science and the United Nations University World Hunger Program WHT R-3/UNUP-129.
- 44 PERALES, HERESI, PIZARRO Y COLOMBO. 1994. "Estudios de funciones cognitivas en escolares de nivel intelectual normal con antecedentes de desnutrición grave y precoz". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 46(4). pp. 282-285
- 45 RAO, R., 1974 " Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses" Journal of Food Science and Technology . (11) pp 213 – 216
- 46 REBOLLEDO; D.B.,1995. "Evaluación química y biológica de una fórmula base de carne de pollo cuya proteína fue modificada enzimáticamente para la rehabilitación nutricional de niños con desnutrición severa y / o diarrea persistente". Escuela de Química. ULSA. México, pp. 1- 27.
- 47 REMINGTON. 1987 "Farmacia". Edit. Médica Panamericana S.A. Heptadécima edición, tomo 2 Buenos Aires, Argentina. Pp. 423 – 421
- 48 RINCON,CARRILLO ARAUJO Y MARTIN.1997. "Contenido de colesterol en carne de pollo y sus productos manufacturados". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 47(1). pp. 81- 83.
- 49 SAMOND, K.W. AND HEGSTED, D.M., 1977 "Animal bioassays: a critical evaluation with for the human In. C. E. Bodwell". Evaluation of proteins for humans Avi. Publishing Co. USA. pp. 68-80.
- 50 SEGURA, MAHECHA, MORENO Y RODRIGUEZ., 1988 "Desarrollo de un producto alimenticio a base de arroz, para uso infantil". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 46 (4). pp. 280-285
- 51 SIMPOSIUM LATINOAMERICANO SOBRE EL DESARROLLO DE ALIMENTOS PARA REGIMENES ESPECIALES. 1997. Instituto Politécnico Nacional. Facultad de Bioquímica México .
- 52 SOTELO,A.,HERNANDEZ, M. Y FRENK, S., 1984. "Evaluación biológica, en ratas y en humanos de un producto lacteo sin lactosa, y de una fórmula proteínica de soya para uso en la desnutrición proteínico-energética" . Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 34(2) pp. 334-338
- 53 SOTELO L. A., AND LUCAS F.B., 1978. "Determinación of Net Protein Utilization Using Whole Caracss, Hind Leg or Liver of the Rat and its Relationship with Protein Efficiency Ratio Determination". Journal of Nutrition., (108). pp.61-66.
- 54 TECHNICON INTERNATIONAL DIVISION. "Thecnical report # 9". Geneva 1974

- 55 TEJADA, H., "Control de calidad y análisis de alimentos para animales". Sistema de Educación continua en producción animal, A.C. México pp 71-77, 88-89
- 56 THOMAS, K., 1919. Citado por Munro 1964. "Historical introduction in mammalian protein metabolism". Vol. 1 charpt. 1, De. H. N. Munro Acad. Press N° 2. Y. and London.
- 57 ULLOA Y VALENCIA. 1993. " Desarrollo de una fórmula médica a partir de un concentrado proteínico de garbanzo". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 43 (1). pp. 50 – 54
- 58 URIBE TREJO F.A., 1987. "Agentes antiglomerantes: uso e importancia en la industria alimentaria". Tesis. Facultad de Química. UNAM. México
- 59 VAJDA, O.T., SAENZ, T.W., 1976. "Química de los Alimentos". Tomo I. Ed. Cientific-Technology. La Habana. pp 135-168.
- 60 VIEIRA. M., 1995. " Contribução do programa de merenda escolar ciclo basico para as recomendações nutricionais de escolares". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 45(2). pp.103 – 110
- 61 WEAVER, SCHMIDL, WOTEKI Y BIDLACK ., 1995 "Necesidades de investigación en dietas, nutrición y salud". Alimentaria. Enero. pp. 25- 29
- 62 WONNACOTT, WONNACOTT., 1991 "Estadística básica práctica". Ed. Limusa. México pp 243-255, 337-338