

5
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACIÓN DEL BIOENSAYO DE UTILIZACIÓN
NETA PROTEÍNIC (NPU) MODIFICADO Y SU
CORRELACIÓN CON EL MÉTODO ORIGINAL

T E S I S
M A N C O M U N A D A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

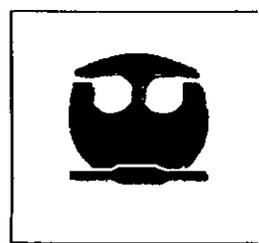
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A N:



IVONNE BAUTISTA
BEDOLLA

EXAMENES PRESENTADOS
RISA HAYMÉ FACULTAD DE
GUZMÁN FRANCO



MÉXICO, D.F.

1999

279141

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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. CORNEJO BARRERA LUCÍA
1er. SUPLENTE	Prof. GIL VIEYRA LETICIA
2do. SUPLENTE	Prof. MIRANDA MARTÍNEZ INÉS

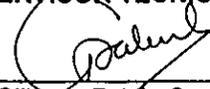
El tema se desarrolló en el conjunto "E", laboratorio 111, 1er. Piso. Departamento de Farmacia (Posgrado). Facultad de Química, U.N.A.M.

ASESOR:



M. en C. Bernardo Lucas Florentino

SUPERVISOR TÉCNICO:



Ing. Gilberto Fabila Carrera



IVONNE BAUTISTA BEDOLLA

SUSTENTANTES:



RISA HAYMÉ GUZMÁN FRANCO

Agradecemos a **Dios** por darnos la oportunidad de vivir y culminar una etapa más de nuestras vidas.

Agradecemos también a **la Universidad Nacional Autónoma de México** por abrirnos sus puertas hacia el inmenso mundo del conocimiento.

Gracias al Maestro **Bernardo Lucas Florentino e Ingeniero Gilberto Fabila Carrera** por brindarnos todo el apoyo y conocimientos necesarios para la realización del presente trabajo.

Para todos aquellos amigos y compañeros con los que siempre hemos contado y que han contribuido a nuestra formación, no sólo personal, sino también profesional.

Deseo agradecer a mis padres **Fidel Guzmán Quispe** y **Antonieta Franco Villegas** por brindarme la vida, su gran amor, ayuda y comprensión durante todo este tiempo; así como a mis hermanos **Ariel, Mayte, Isbelia** y **Mariel**, de quienes he aprendido demasiado y con quienes siempre he podido contar.

Del mismo modo deseo agradecer a todos aquellos amigos y compañeros de **Cocoas y Chocolates "La Corona"** que me brindaron todo su apoyo y comprensión para la culminación de esta tesis.

A mi sobrina **Tania** por la infinita alegría, entusiasmo e ilusión que le ha inyectado a mi vida.

Con todo mi amor para la persona que le ha dado un nuevo sentido a mi vida...**FREDI**.

RISA HAYMÉ GUZMÁN FRANCO.

A mis padres Teresa Bedolla
y Alfredo Bautista por brindarme
siempre su apoyo incondicional,
darme su cariño, comprensión,
confianza y por impulsarme a ser
mejor cada día.

A mis hermanas Berenice y Maribel
por ser mis compañeras de juegos,
su confianza y ser parte de ese
impulso que me llevó a conseguir
mi meta.

A todos mis tíos en especial a
Rosario, Julia, Flor, Carmen,
Carlos por su cariño y alientos.

A mis sobrinas Mariel y Karen
por llenar de alegría mi vida,
esperando que les sirva de
estímulo para lograr lo que se
propongan.

A Jesús por venir a ocupar
un espacio especial en mi
vida, que nadie más podrá
llenar y hacerme sentir un
ser pleno en todos los
sentidos.

IVONNE B. B.

C O N T E N I D O

PRÓLOGO	8
OBJETIVOS	10
GENERALIDADES	
Proteínas y su calidad	11
Aminoácidos en los alimentos	14
Determinación de aminoácidos	17
Triptofano	18
Calificación química (S.Q.)	19
Índice de aminoácidos indispensables (I.A.A.E.)	21
Evaluación biológica de las proteínas	23
Técnicas de evaluación biológica (Métodos Biológicos)	24
Factores a considerar para realizar una prueba biológica	25
Relación de Eficiencia de la Proteína (PER)	28
Relación Neta de la Proteína (NPR)	29
Utilización Neta de la Proteína (NPU)	31
Fuentes de proteína	34
Descripción de fuentes de proteína utilizadas	37
METODOLOGÍA	
Selección de fuentes de proteína	48
Análisis proximal	49
Elaboración de dietas	51
Determinación de contenido calórico	53
Determinación de aminoácidos	56
Determinación de triptofano	63

Predicción de la calidad proteínica por métodos químicos	65
Pruebas biológicas	67
Relación de Eficiencia de la Proteína (PER)	69
Relación Neta de la Proteína (NPR)	71
Utilización Neta de la Proteína (NPU) original	73
Utilización Neta de la Proteína (NPU) modificado	76
Análisis estadístico	78
Análisis de varianza	82
Correlación y regresión	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Caracterización de las fuentes de proteína	85
Análisis proximal	85
Contenido calórico	88
Determinación de aminoácidos	89
Ensayo preliminar	94
Ensayo final	98
Relación de Eficiencia de la Proteína (PER)	102
Relación Neta de la Proteína NPR)	105
Índices químicos de calidad proteínica	106
Utilización Neta Proteínica (NPU) original	108
Análisis estadístico del ensayo preliminar	110
Análisis estadístico del ensayo final	114
Utilización Neta Proteínica (NPU) modificado	120
Utilización Neta Proteínica (NPU) original y modificado	122
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	133
APÉNDICE	137

P R Ó L O G O

La desnutrición es un problema de salud pública que concierne principalmente a los niños, reflejando generalmente las condiciones nacionales de vida, así como de sus propios hogares, es decir, condiciones económicas, sociales y ambientales. Aunque la desnutrición no está restringida a una determinada área geográfica, edad, grupo económico, social o cultural, la desnutrición ocurre principalmente en tierras no fértiles y en países con una limitada infraestructura en la distribución de los víveres hacia el interior del país.

En la nutrición humana, además de otros nutrimentos, es de suma importancia evaluar el balance de aminoácidos y su biodisponibilidad en un alimento. Una evaluación biológica de este tipo lo constituye la Utilización Neta de la Proteína (NPU), que nos indica la relación de nitrógeno retenido del nitrógeno ingerido. Evaluando la biodisponibilidad de los aminoácidos de la proteína, así como el perfil de éstos, en especial de los denominados indispensables, podemos considerar que la prueba del NPU nos da un buen método de evaluación biológica, siempre y cuando se tenga un adecuado desarrollo de la prueba, de acuerdo a las condiciones definidas y con los controles necesarios. Algunos autores han reportado modificaciones para simplificar el método original resultando ser algunas de estas modificaciones tediosas y caras; dentro de estas modificaciones se ha reportado una alta correlación entre el NPU calculado a partir de la concentración de nitrógeno retenido en el canal del animal sin vísceras (carcass) y el NPU calculado a partir de la concentración de nitrógeno retenido en la pierna posterior y en el hígado; sin embargo, no se ha logrado discriminar totalmente entre las diferentes calidades de proteína de la misma forma en la que lo hace el NPU calculado a partir de la concentración de nitrógeno del carcass, además de que se ha empleado, en mayor o menor grado, una restringida variedad de fuentes de proteína (Lachance and Miller, 1973; Sotelo and Lucas, 1978).

El presente trabajo tiene la finalidad de probar algunas modificaciones (empleo del hígado) y proponer otras (uso de riñones, corazón, bazo, intestino y patas delanteras) en una necesidad de disponer, para fines prácticos, de un método de balance de nitrógeno más simple, fácil, rápido y económico para evaluar y discriminar la calidad de una proteína, haciendo uso de un mayor rango de calidad proteínica.

Se desarrolló un diseño experimental mediante una Regresión Multivariable por Etapas y empleando un modelo cuadrático completo, para evaluar las modificaciones propuestas y así encontrar el Modelo Predictor que nos permitiera pronosticar la concentración de nitrógeno del carcass, utilizando la concentración de nitrógeno de los riñones y el corazón. Tanto el NPU original como el modificado lograron discriminar entre las diferentes calidades de fuentes de proteína. También se encontró una alta correlación entre esta modificación y el método original, así como con métodos químicos y de predicción biológica, empleando un amplio rango de calidad de proteína.

O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar el diseño experimental para tratar de encontrar el órgano o tejido que pueda sustituir el carcass en la prueba biológica de Utilización Neta de la Proteína (NPU), empleando un mayor número de fuentes de diferente calidad proteínica, tanto de origen animal como vegetal, abarcando el mayor rango de calidad proteínica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Caracterizar las fuentes de proteína, desde el punto de vista nutritivo, determinado con índices biológicos e índices químicos.
2. Realizar un ensayo preliminar con varios órganos o tejidos para determinar cual de ellos muestra la mejor correlación con el método original, para desarrollar el ensayo final con la parte anatómica seleccionada.
3. Averiguar si es posible encontrar una más alta correlación entre el método original de NPU y el modificado, haciendo uso de otros órganos además de los ya estudiados, empleando un mayor espectro de alimentos para evaluar la calidad proteínica.
4. Conocer si hay correlación entre el método modificado y otros índices biológicos y químicos de predicción de calidad proteínica.

G E N E R A L I D A D E S

PROTEÍNAS Y SU CALIDAD

Las proteínas son la unidad primaria de los organismos vivos y el constituyente más importante de los alimentos, el material con el cual se construye la mayor parte de la materia sólida de los tejidos del músculo y de varios órganos del cuerpo, tales como el corazón, riñones y pulmones. No hay forma de vida que exista sin proteínas. Existe una cantidad ilimitada de proteínas, por lo tanto, no se ha podido llegar a una clasificación muy rígida. Se han intentado clasificar de acuerdo a su composición de aminoácidos y la cantidad de aminoácidos que contienen, así como de acuerdo a su arreglo, pero muchas proteínas tienen una distribución similar de aminoácidos. Los aminoácidos en una proteína están unidos por enlaces químicos, en la proteína se encuentran en diferentes cantidades siguiendo la secuencia característica de cada proteína, esta unión es el enlace peptídico (Altschul, 1958).

Las propiedades de solubilidad de una proteína pueden ser modificadas o dañadas drásticamente cuando son sometidas primordialmente a calentamiento, lo que cambia de una proteína es el arreglo ordenado de los péptidos por la ruptura de los puentes de hidrógeno. Cuando esto ocurre se dice que la proteína se ha desnaturizado. Aquí hay que señalar que existen muchos factores por los cuales una proteína se desnaturiza y no es sólo por un cambio en la temperatura, sino que también se puede dar por un cambio de pH, por ejemplo. El valor nutritivo de una proteína es dañado sólo cuando los aminoácidos son destruidos o cuando se genera un cambio en el arreglo de los péptidos de una proteína. La función primaria de las proteínas de la dieta es suministrar aminoácidos para la formación de nuevos tejidos y para reemplazar los aminoácidos catabolizados en

el ciclo continuo de síntesis y degradación de las proteínas que tiene lugar en los tejidos (recambio de proteínas); también para la síntesis de muchas estructuras específicas (hormonas y enzimas). Su función secundaria consiste en servir como fuente complementaria de energía, al ser desdobladas en urea con liberación de energía (Fox y Cameron, 1992 ; Muller y Tobin, 1992).

Estructuralmente el músculo está constituido por proteínas, otra función estructural de las proteínas son los enzimas, las cuales son una parte vital de todo metabolismo en cualquier organismo vivo. Los enzimas son proteínas especializados que en algunas ocasiones se encuentran combinadas con otras estructuras químicas y realizan una infinidad de funciones en los organismos vivos, que van desde construir un tejido hasta generar energía a partir de los alimentos. Muchas hormonas están constituidas también por proteínas. Los mecanismos de transformaciones metabólicas, tanto en plantas como en animales, se efectúan mediante coordinados sistemas enzimáticos. Las hormonas son complicadas organizaciones que coordinan y controlan diferentes procesos, son mensajeros químicos (Altschul, 1958).

Cuando la dieta consiste de una variedad limitada de alimentos, la calidad de la proteína debe ser tomada en consideración, para obtener un adecuado suministro de aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el organismo animal (indispensables). Dada la importancia de las proporciones de aminoácidos indispensables en la determinación de la calidad de la proteína, se han propuesto técnicas en las que se puede utilizar la estimación de la composición en aminoácidos para predecir su calidad, midiendo su contenido de aminoácidos y comparándolo con una proteína de referencia, según las necesidades dietéticas ideales, como es la propuesta por la FAO (FAO, 1970). Los tres métodos más importantes para determinar la composición de aminoácidos de una proteína son: métodos microbiológicos y químicos para aminoácidos individuales y específicos y la cromatografía de intercambio iónico para obtener en un análisis todo el perfil de aminoácidos:

1. Los **ensayos microbiológicos** se basan en la identificación de cepas microbianas que tienen necesidades particulares de aminoácidos para su crecimiento óptimo. Estos ensayos requieren de un personal altamente capacitado, lo que hace que en la actualidad no se puedan aplicar en forma general para predecir la calidad de la proteína de una amplia variedad de alimentos. Este método ha sido desplazado por la cromatografía de intercambio iónico, el cual depende en gran parte de las interacciones electrostáticas entre las cargas eléctricas de los aminoácidos y los grupos funcionales de la resina de intercambio iónico (Pellett and Young, 1980).

2. La **calificación química** o cómputo químico, introducido por primera vez por Block y Mitchell en 1946, se basa en señalar la cantidad del aminoácido indispensable que está en mayor deficiencia en la proteína en estudio, al compararla con el nivel presente en una proteína de referencia. El aminoácido que se encuentra en menor cantidad respecto al estándar es el aminoácido limitante, puesto que será el que determine la utilidad de la proteína (Block and Bolling, 1951).

3. La determinación de la calidad de la proteína por **métodos biológicos** se basa en dos observaciones principales: cuanto mejor sea la calidad de la proteína tanto mayor será la velocidad de crecimiento, así como mayor será la cantidad de nitrógeno de la proteína retenido en el cuerpo. Los métodos de la Relación de Eficiencia de Proteína (PER) y la Relación Neta de la Proteína (NPR) representan los principales métodos biológicos basados en la medida de la proteína ingerida y del peso corporal. Son de realización relativamente simple y requieren el mínimo equipo especial, pese a ciertos inconvenientes como el no discriminar la obesidad. Los métodos que se basan en el balance de nitrógeno consideran la medida del nitrógeno ingerido y del nitrógeno excretado por heces y orina o la medida de la cantidad de nitrógeno retenido en la canal en relación con la cantidad de nitrógeno ingerido (Utilización Neta de la Proteína, NPU) (Muller y Tobin, 1992).

Comparando los valores químicos con la calidad de la proteína determinada por técnicas biológicas, se observa que la evaluación química constituye una buena estimación de la calidad de la proteína para una amplia gama de productos, pero para productos que difieren ampliamente en su digestibilidad del nitrógeno, ya sea por causas naturales como es la presencia de factores tóxicos y antinutricionales o debidas al procesamiento del alimento, proporcionan valores que pueden sobrestimar la verdadera calidad nutritiva. Si los valores de digestibilidad no son similares en relación con las evaluaciones químicas y los ensayos biológicos, entonces serán incorrectos (Muller y Tobin, 1992).

Históricamente las técnicas de balance de nitrógeno fueron usadas en primera instancia; sin embargo, los métodos de nitrógeno corporal tienen desventajas, ya que la pérdida dérmica es ignorada, aunque todos los métodos podrían dar el mismo valor. Además, el balance de nitrógeno se ve afectado por muchos factores como son: el nivel de proteína, el desbalance de aminoácidos, la ingesta calórica, cuando la fuente de proteína se encuentra en una mezcla de alimentos, el tipo y cantidad de grasa en la dieta, el nivel de fibra, la composición mineral, la humedad de la dieta y la presencia de factores antinutricionales. A pesar de lo anterior, todos estos factores son inherentes a todos los bioensayos y se pueden estandarizar (Goena, 1988; Takahashi, 1994).

AMINOÁCIDOS EN LOS ALIMENTOS

Aminoácidos indispensables.

De los 20 aminoácidos comunes que constituyen a las proteínas, 8 no se pueden ser sintetizados por el cuerpo, por lo tanto deben ser suministrados en la dieta ya formados en los alimentos proteínicos. A estos aminoácidos se les denomina aminoácidos indispensables. La histidina es otro aminoácido indispensable pero únicamente para los bebés puesto que éstos no poseen un sistema enzimático lo

suficientemente desarrollado como para formar dicho aminoácido en las cantidades requeridas para su crecimiento. De los 11 aminoácidos restantes (no indispensables), 2 requieren de la presencia de los aminoácidos indispensables para su síntesis en el organismo: la fenilalanina para sintetizar tirosina, así como la metionina para sintetizar cistina (Pellet and Young, 1980).

TABLA 1. AMINOÁCIDOS INDISPENSABLES Y NO INDISPENSABLES.

INDISPENSABLES	NO INDISPENSABLES
Fenilalanina	Ácido aspártico
Leucina	Ácido glutámico
Isoleucina	Alanina
Lisina	Arginina
Metionina	Cisteína
Treonina	Cistina
Triptofano	Glicina
Valina	Hidroxiprolina
	Prolina
Además para los niños:	Serina
Histidina	Tirosina

Necesidades de aminoácidos en el hombre.

El comité de expertos de la FAO/OMS ha valorado las necesidades de aminoácidos en los niños a partir de los datos obtenidos mediante experimentos alimentarios. Sin embargo, a pesar de que la necesidad de aminoácidos indispensables disminuye con la edad, relación poco conocida, las recomendaciones de la FAO/OMS/ONU para los adultos se han basado hasta hace poco tiempo en los datos obtenidos con niños de edad preescolar (Robinson, 1991).

TABLA 2. NECESIDADES DE AMINOÁCIDOS¹.

AMINOÁCIDO	NIÑOS	ADOLESC. (10-12 años)	ADULTOS	(ADULTOS/NIÑOS) X 100
Isoleucina	70	30	10	14.3
Leucina	161	45	14	8.7
Lisina	103	60	12	11.6
Metion. + Cisteína	58	27	13	22.4
Fenilal. + Tirosina	125	27	14	11.2
Treonina	87	35	7	8.0
Triptofano	17	4	3.5	20.0
Valina	93	33	10	10.7
Histidina	28	-	-	-
TOTAL	742	261	83.5	

1) FAO/OMS/ONU, 1985; dado en mg/Kg de peso corporal/día.

Globalmente la ingesta de proteína recomendada por FAO/OMS/ONU cae exponencialmente con la edad, partiendo de un valor elevado de 1.86 g por día por Kg en los niños, hasta aproximadamente 0.75 g por día y por Kg de peso corporal en el hombre adulto. La ingesta diaria de aminoácidos indispensables disminuye con la edad a una velocidad mayor que la ingesta de proteína diaria total recomendada, lo que significa que la necesidad de que una proteína suministre todos los aminoácidos indispensables en cantidades requeridas cae substancialmente con la edad. Debe considerarse otros parámetros variables, como la composición, la raza y el estado fisiológico que pueden influir en las necesidades de los aminoácidos (FAO/WHO, 1973).

TABLA 3. NECESIDADES DE AMINOÁCIDOS INDISPENSABLE PARA HUMANOS¹.

AMINOÁCIDO ESENCIAL	(mg / g proteína)	(mg / g nitrógeno)
Isoleucina	40	250
Leucina	70	440
Lisina	55	340
Metion. + Cisteína	35	220
Fenilal. + Tirosina	60	380
Treonina	40	250
Triptofano	10	60
Valina	50	310
TOTAL	360	2,250

1) La histidina se considera como aminoácido indispensable únicamente para los niños.
FAO/WHO, 1973.

DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

La determinación cuantitativa de los aminoácidos de una proteína guarda una estrecha comparación a lo que se realiza en el análisis químico elemental de una simple molécula orgánica; es decir, se busca una característica primaria cuando se quiere determinar la composición de aminoácidos de una proteína. La exactitud de dicho análisis es de suma importancia y es conveniente realizarlo con rapidez y facilidad. Las anteriores características se han podido integrar con el desarrollo de equipos automatizados en los últimos años. En la actualidad el uso de la cromatografía de intercambio iónico con resinas específicas (resina de poliestireno sulfonatada), acoplada a bombas especiales que mantienen un flujo constante de las soluciones eluyentes y a aparatos de registro electrónico automático, han permitido el desarrollo de los llamados autoanalizadores de aminoácidos, que realizan el análisis de una proteína con increíble rapidez y una adecuada precisión (Muller y Tobin, 1992).

La naturaleza de las condiciones de hidrólisis ácida completa, juega un papel de gran importancia en el análisis de aminoácidos de una muestra de proteína con el fin de obtener su composición. El método particular de hidrólisis de proteínas previo a el análisis de aminoácidos, es de considerable interés debido a que ciertos aminoácidos son destruidos y la liberación de otros es incompleta; lo anterior se acentúa más con las técnicas modernas de alta precisión que se utiliza hoy en día como lo es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Oser, 1959).

Triptofano.

Las proteínas están expuestas a varias condiciones de oxidación durante su procesamiento. Los resultados de la oxidación son la destrucción de los aminoácidos más sensibles: triptofano, metionina y cisteína. La degradación es alta cuando también lo es el Aw, la temperatura y la concentración de oxígeno. En la determinación de aminoácidos se pueden utilizar hidrólisis ácidas, alcalinas o enzimáticas. El triptofano esta presente en bajas concentraciones y es ampliamente degradado por oxidación durante la hidrólisis ácida siendo imposible su medición mediante dicha hidrólisis, por lo que se emplea una hidrólisis alcalina específica para su cuantificación (Mauro, 1986; Macrae, 1993).

Después de la publicación de Hopkins y Cole en 1902 acerca del aislamiento del triptofano por digestión enzimática de caseína, una multitud de métodos fueron propuestos para la estimación de dicho aminoácido, ya sea en la proteína intacta o en su hidrolizado. La mayor parte de los métodos aprovechan la gran reactividad del anillo de indol de los residuos de triptofano como son:

- Tratamiento con agentes oxidantes como cloruro férrico, bromuro, sulfato cúprico, nitrito de sodio en solución ácida.
- Con nitrato de potasio y un aldehído alifático en ácido clorhídrico o sulfúrico concentrado.

- Con ciertos aldehídos aromáticos como *p*-dimetilaminobenzaldehído en medio fuertemente ácido.

En términos generales podemos decir que con los métodos químicos, espectrofotométrico y microbiológicos, la cuantificación del triptófano en proteínas puras o péptidos, es llevada a cabo con relativa facilidad. Sin embargo, cuando se quiere aplicar a materiales biológicos complejos como son los productos alimenticios, se presenta una gran variedad de problemas. Uno de ellos lo constituye las condiciones de hidrólisis para liberar el triptófano del enlace peptídico y en la actualidad se menciona una gran variedad de formas para llevar a cabo la hidrólisis, siendo muy pocas las que dan resultados satisfactorias (Aragón y Lucas, 1991).

Calificación Química (S.Q.).

En 1946 Block y Mitchell reportaron los resultados de un estudio de la relación entre la composición de aminoácidos y el valor biológico en un rango de proteínas alimenticias. Asumieron que el huevo entero contiene, por unidad del total de nitrógeno, una adecuada cantidad (pero no en exceso) de cada aminoácido de los requeridos en la dieta para el crecimiento de las ratas; entonces compararon el nivel de cada aminoácido presente en la proteína de estudio con los presentes en la proteína del huevo entero. Por este método fue calculada la calificación química (S.Q.), la cual representa el grado de deficiencia del aminoácido indispensable en una proteína nutritiva, introduciendo el concepto del valor nutritivo de una proteína en base a su contenido de aminoácidos. La calificación química de las proteínas estudiadas por Block y Mitchell mostraron correlación con el correspondiente valor biológico determinado por el método de balance de nitrógeno en ratas. Sin embargo, esta composición es al menos un importante factor a cuantificar en la determinación del rendimiento fisiológico, cuyo propósito es la comparación en el grado de correspondencia entre la composición de aminoácidos y las necesidades de los animales (Mitchell and Block, 1946; Block, and Mitchell, 1946).

El patrón, que incluye la histidina, indica que los niños necesitan 460 mg de aminoácidos indispensables por gramo de proteína de referencia y que este valor disminuye con la edad para proteínas de alta calidad. Por tanto, utilizando los patrones de FAO/OMS/ONU, la cantidad adecuada de proteínas que deben consumir los niños de edad preescolar (2-5 años) y los adultos puede estimarse separadamente a partir de su composición de aminoácidos.

TABLA 4. REQUERIMIENTO DE AMINOÁCIDOS¹.

AMINOÁCIDOS	NIÑOS (2-5 AÑOS)	ADULTOS
Histidina	19	16
Isoleucina	28	13
Leucina	66	19
Lisina	58	16
Metionina/Cisteína	25	17
Fenilalanina/Tirosina	63	19
Treonina	34	9
Triptofano	11	5
Valina	35	13
TOTAL (con histidina)	339	127
TOTAL (sin histidina)	320	111

1) FAO/OMS/ONU, 1985. Los datos están expresados en mg aminoácido / g proteína.

Con este fin se determinan valores químicos relacionados con el patrón FAO/OMS para los aminoácidos individuales mediante la relación que se muestra más adelante. Para la proteína a analizar, el aminoácido limitante es el componente que determina el valor global de la proteína. Sin embargo, este método tiene una serie de desventajas; la primera, que la eficiencia depende de la proteína de referencia elegida; la segunda, que el patrón de referencia todavía combina los aminoácidos azufrados así como los aromáticos, por lo que enmascara la existencia de algún tipo de deficiencia de los aminoácidos individuales estrictamente indispensables, como la metionina o la fenilalanina; la tercera, que

los aminoácidos medidos por análisis químicos pueden no estar disponibles biológicamente, ya que los animales tienen que digerir y asimilar las proteínas antes de que sean una fuente eficaz de nutrimentos. El contenido de aminoácidos en una proteína puede no reflejar el valor nutritivo real porque algunos de los aminoácidos no son aprovechados por el organismo. Los problemas en la determinación de aminoácidos en proteínas han sido revisados ampliamente en la literatura. Por ejemplo, el procedimiento más satisfactorio para el análisis de lisina aprovechable se basa en la reacción del di-nitrofluorobenceno con el grupo épsilon de la lisina.

$$\text{S.Q.} = (\text{mg aa indispensable} / \text{g proteína})_x / (\text{mg aa indispensable} / \text{g proteína de referencia})_R$$

Donde: S.Q. = Calificación Química.

aa indispensable = aminoácido indispensable.

x = proteína por evaluar.

R = proteína de referencia.

Índice de Aminoácidos Indispensables (I.A.A.E.).

La utilización de la proteína en la dieta para el crecimiento y mantenimiento depende de la cantidad de los aminoácidos indispensables y del grado de degradación y rapidez de digestión de las proteínas. En la completa ausencia de cualquiera de los aminoácidos indispensables para las especies animales, el crecimiento y supervivencia no es posible, ya que todos los aminoácidos participan en la síntesis de la proteína y son intrínsecamente indispensables en el metabolismo, pero aquéllos que no pueden ser sintetizados por el hombre o el animal en estudio son los llamados aminoácidos indispensables en la dieta (Oser, 1959).

El valor nutritivo de cualquier proteína o mezcla de aminoácidos indispensables para un animal debe ser relacionado con las necesidades individuales para el crecimiento y mantenimiento. Las variables que se deben considerar son el sexo, edad y estado con respecto a la lactancia, enfermedad, convalecencia e historial en el aspecto nutritivo. Por esta razón, es necesario tomar una proteína como estándar, una proteína de óptimo valor nutritivo de acuerdo a un criterio biológico. Dentro de los estándares recomendables para comparar la proteína de la muestra están la leche humana y la proteína del huevo entero (Oser, 1959).

Esta comparación deriva en el cálculo del índice de aminoácidos indispensables (I.A.A.E.), el cual esta basado en la proporción mínima del contenido relativo de aminoácido indispensables de la muestra con respecto al que hay en una proteína estándar que puede ir de 1.0% hasta un 100%. Se define como la media geométrica de las proporciones de los aminoácidos de la muestra y los aminoácidos del estándar. Calculándose de la siguiente manera:

$$IAAE = \sqrt[n]{\frac{aai \text{ muestra}}{aai \text{ std}} (1) \times \dots \times \frac{aai \text{ muestra}}{aai \text{ std}} (n)}$$

Donde: IAAE = Índice de aminoácidos indispensables en el alimento.

aai muestra = Aminoácidos indispensable en la proteína del alimento.

aai std = Aminoácido indispensable en la proteína estándar.

n = Número de aminoácidos (debe considerarse como un valor la suma de aminoácidos azufrados y de aminoácidos aromáticos).

El contenido de aminoácidos es usualmente expresado en una base de 16 g de nitrógeno. Sin embargo, el índice de aminoácidos indispensables puede ser computado del contenido de aminoácidos relativo al nitrógeno total en la muestra y en el estándar, es decir, debe haber uniformidad de unidades de expresión de los aminoácidos, ya que una aplicación del I.A.A.E. es la de poder predecir los valores biológicos y, a partir de éste, estimar las combinaciones de proteína o

suplementarlas con un aminoácido individual o combinaciones. Debe hacerse notar que el valor predicho por el I.A.A.E. puede o no corresponder al experimental, ya que hay otros factores que afectan el aprovechamiento de la proteína (estado de salud, sexo, degradación de la proteína, etc.) (Oser, 1959).

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS

El papel primordial de una proteína es el de suministrar los aminoácidos indispensables al organismo después de haberse digerido por acción de las enzimas del tracto digestivo. La composición en aminoácidos es un parámetro importante para determinar la calidad de una proteína, nutritivamente hablando, pero es insuficiente para asegurar su función de nutrir al organismo que la ingiere porque es necesario considerar la disponibilidad de estos aminoácidos y su equilibrio utilizando como patrón de referencia la mezcla de aminoácidos propuesta por la FAO o con la proteínas del huevo (Bourgeois et Le Roux, 1982).

Un índice químico no considera la biodisponibilidad biológica de los aminoácidos, ya que ciertas funciones pueden estar bloqueadas de manera natural o como consecuencia de un tratamiento tecnológico. Por lo que es necesario determinar la digestibilidad de las proteínas efectuada por enzimas específicas que deben contar con una estructura espacial mas o menos bien adaptada. Las pruebas de digestibilidad *in vivo*, integran la digestibilidad de una proteína y consideran los fenómenos de absorción intestinal donde la estructura de los péptidos liberados intervienen en la eficiencia de la utilización de una proteína.

Además de su función nutritiva, las proteínas desempeñan un papel importante en la palatabilidad de los alimentos, las proteínas en la mayoría de las ocasiones son incorporadas a mezclas complejas de alimentos donde la palatabilidad resulta importante, ya que en algunas ocasiones ésto es mucho más importante para el consumidor que el aspecto nutritivo, aunque este cumpliendo esta función.

TÉCNICAS DE EVALUACIÓN BIOLÓGICA (MÉTODOS BIOLÓGICOS)

La obligación de evaluar la calidad nutritiva de una proteína creó la necesidad de generar diversos métodos para poder conocer esta calidad. Estos métodos incluyen el balance de nitrógeno, la digestibilidad, la economía del nitrógeno, ganancia en peso y otros, aplicado a animales de experimentación (bioensayos).

Importancia de los estudios con animales.

Aunque se cuenta con métodos químicos y físicos para la evaluación de las proteínas, los estudios con animales de laboratorio tienen mayor relevancia al momento de evaluar los diversos elementos nutritivos útiles para el cuerpo humano. Los resultados obtenidos pueden ser extrapolados al ser humano.

Hegsted y Mitchell, reportaron independientemente que el hombre tiene un metabolismo semejante a la rata en cuanto a su utilización de los alimentos proteínicos en lo que concierne al crecimiento, indicando que los resultados de las pruebas de crecimiento en ratas podían ser aplicables para la evaluación de dietas en humanos. Por esta razón y las que se mencionan a continuación, las ratas son ampliamente utilizadas en ensayos nutritivos:

- ❖ Las ratas son animales omnívoros que pueden ser alimentados con la misma ración a lo largo de toda su vida, si dicha ración es adecuada nutritivamente hablando.
- ❖ Son de fácil manejo y cuidado.
- ❖ Un número relativamente grande de individuos puede ser colocado en una área pequeña.
- ❖ Hay un largo periodo después del destete, durante el cual continúa creciendo e incrementando su peso corporal, lo cual es de suma importancia en los estudios nutritivos, donde se requiere de animales que continúen ganando peso durante periodos extensivos.

Factores a considerar para realizar una prueba biológica.

- ❖ Edad de la rata. Existe una diferencia altamente significativa entre los resultados de PER obtenidos con ratas de 22, 36 y 45 días de edad, como consecuencia de esto se recomendó utilizar ratas en edades de 21 ± 2 días de nacidas. El A.O.A.C. recomienda ratas entre las edades de 21 a 23 días de nacidas (Campbell, 1961).
- ❖ Tiempo de experimentación. Se han realizado diferentes estudios empleando diversos periodos de tiempo que fluctúan entre 1 y 12 semanas. Sin embargo, se encontró que la ganancia en peso de los animales cambia progresivamente con la edad, por lo que es importante utilizar animales de la misma edad y peso previa experimentación, recomendándose utilizar animales jóvenes los cuales van a utilizar la proteína ingerida para el crecimiento incorporándola a sus tejidos. Se recomienda un periodo de tiempo de 14 días, ya que se obtiene una menor variación estándar. Champan demostró que la variación aumenta entre los animales después de las 4 semanas de experimentación.
- ❖ Nivel de proteína. Los resultados obtenidos en los ensayos biológicos varía de acuerdo al nivel de proteína, esto se ha relacionado con las diferencias en el contenido de aminoácidos en la proteína de prueba. Por esta razón, se considera que el nivel adecuado de proteína en una dieta experimental es del 10 % para determinar la calidad de una proteína.
- ❖ El sexo de la rata. Se ha demostrado que las ratas hembras dan valores máximos de crecimiento que los que dan los machos en dietas con bajo nivel de proteína. Las hembras no ganan peso tan rápidamente como los machos y la variación entre grupos no fue consistentemente pequeña. Por estas razones se prefiere el empleo de machos.

- ❖ La estirpe de la rata. Se ha demostrado que existen diferencias significativas con diferentes estirpes de ratas

Además de estos factores hay que considerar que no debe existir diferencia entre los ingredientes de una dieta. Los ingredientes presentes en las dietas experimentales deben estar presentes en el mismo nivel y ser del mismo tipo en todos los casos, para evitar diferencias que puedan afectar los resultados. La reproducibilidad de los resultados obtenidos en los ensayos biológicos depende de muchos detalles del ensayo, el cual debe estar muy bien estandarizado. Los factores más importantes son: el nivel de proteína, la especie, la edad y sexo del animal, duración del ensayo, método de alimentación, el uso de condiciones ambientales adecuadas (Helrich, 1990).

Al momento de evaluar una proteína hay que tener en cuenta que se pueden presentar diferentes problemas al considerar que la proteína es una identidad simple, lo cual no es así, ya que esta formada por una colección de varios aminoácidos combinados en diferentes maneras y en varias concentraciones (Altschul, 1958). Haciéndose necesario considerar los siguientes aspectos:

- ❖ Si la proteína es una nueva fuente de aminoácidos hay que estudiar su potencial, determinando en primer lugar su contenido de nitrógeno y, posteriormente, su contenido en aminoácidos. También se debe considerar si es apta para el consumo animal y, subsecuentemente, su digestibilidad y adecuación de su contenido de aminoácidos y composición respecto a los aminoácidos indispensables.
- ❖ Los efectos de deterioro de la proteína ocasionados por procesos tecnológicos de transformación, donde se pueden variar la temperatura, la humedad, el tiempo de cocción, el tostado, secado, etc. En estos casos es más importante realizar una evaluación biológica de la proteína para determinar el efecto de

estos factores en la biodisponibilidad de los aminoácidos, primordialmente los indispensables, de la proteína en estudio .

- ❖ Si se trata de concentrados de proteína o de fuentes de aminoácidos específicos, las proteínas varían ampliamente en cuanto a su contenido de aminoácidos, por lo que es necesario considerar a cada proteína de manera individual y considerar si están contribuyendo a la dieta con una cantidad considerable de un aminoácido en especial.
- ❖ El mayor factor que determina la cantidad de alimento que se consume *ad libitum* son las necesidades energéticas y, por lo tanto, las necesidades de aminoácidos. Se ha demostrado que dietas con un bajo nivel energético se consumen en mayor cantidad que aquellas que son ricas energéticamente hablando, entonces al ser constante el contenido de proteína con relación a los demás componentes de una dieta con un bajo nivel energético habrá un mayor consumo de alimento y, por lo tanto, de aminoácidos por día. Este factor carece de importancia en dietas que además de ser isoproteínicas son isocalóricas (Altschul, 1958; Bourgeois et Le Roux, 1982).
- ❖ Considerar si el animal experimental se encuentra en etapa de reproducción o preñada, ya que incrementa la demanda de los requerimientos proteínico-energéticos, es decir, se da un incremento en las necesidades de aminoácidos y de energía.
- ❖ También hay que considerar otros elementos nutritivos, como algunas vitaminas, así como algunos inhibidores y factores antinutricionales presentes principalmente en alimentos de origen vegetal que afectan considerablemente la utilización de los aminoácidos.

Relación de Eficiencia de la Proteína (PER).

El nivel de crecimiento de un animal bajo condiciones bien definidas, es un buen índice para evaluar la calidad nutritiva de un alimento. Si la proteína en estudio es insuficiente en uno o más aminoácidos indispensables se refleja en el crecimiento, ya que este puede ser reducido o no presentarse. En 1919 Osborne, Mendel y Ferry introdujeron el concepto de PER ("Protein Efficiency Ratio"), el cual es el procedimiento más ampliamente usado dentro de las pruebas biológicas en la evaluación de una fuente de proteína. Generalmente se acepta que el incremento en peso de ratas destetadas alimentadas con una dieta, bajo condiciones estandarizadas, provee una medida confiable del valor nutritivo de una proteína dietética. Factores tales como la edad, sexo, tiempo de experimentación, etc., pueden afectar la determinación del PER. Las condiciones de experimentación deben estar bien definidas. Both, Hegsted y Mitchell mencionan que los resultados obtenidos a partir de la evaluación del crecimiento en ratas y su metabolismo de utilización de las proteínas en la dieta se correlaciona muy bien con los resultados obtenidos en el humano. A pesar de que da buenos resultados en el caso de productos que sólo contienen pequeñas cantidades de proteína, este ensayo es incapaz de asignar un valor a las proteínas de baja calidad que sólo pueden ser adecuadas para cubrir una parte de las necesidades de mantenimiento de la proteína. No es recomendable la evaluación de una proteína la cual no soporte el crecimiento ya que se obtienen resultados muy variables y no se puede estandarizar el valor negativo. Es mejor realizar la evaluación por medio de la Utilización Neta de la Proteína (NPU) (Campbell, 1961).

Es el método biológico más simple para evaluar la calidad de la proteína y se define como la ganancia en peso por gramo de proteína ingerida. Esta técnica permite categorizar las proteínas por orden de calidad, sobre todo cuando son ensayadas simultáneamente. La crítica más fuertemente hecha al PER es que considera que toda la proteína ingerida es utilizada para el crecimiento. De lo anterior se deriva la necesidad de contar con métodos de balance de nitrógeno. El

balance de nitrógeno es afectado por muchos factores, incluyendo el nivel de proteína, el balance de aminoácidos, la ingesta calórica, la presencia de hormonas y la estación del año (Campbell, 1961).

Retención Neta de la Proteína (NPR).

Bender y Doell propusieron el uso de la Relación Neta de la Proteína (NPR), el cual es simplemente la pérdida de peso del grupo de control negativo (grupo con dieta libre de nitrógeno, DLN) mas la ganancia en peso del grupo de prueba, todo esto entre la proteína ingerida. El NPR salva el inconveniente de no poder asignar un valor a las proteínas de baja calidad, pues determina la cantidad de peso corporal que se perdería si no se ingiriese proteína durante un período de tiempo determinado, ya que antes de que se consiga incrementar el peso corporal la proteína problema tiene que cubrir o compensar esta pérdida de peso. Esta prueba es similar al PER y estima la cantidad de peso corporal que tiene que ser reemplazado 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. Puede cuantificar incluso el valor nutritivo de las proteínas de baja calidad, pero no puede evaluar la presencia de algún factor tóxico o antinutricional en la proteína y, por lo tanto, puede sobrestimar su calidad (Altschuls, 1958).

En esta prueba se asume que la proteína requerida para prevenir la pérdida endógena de las ratas alimentadas con una dieta libre de nitrógeno (DLN), es equivalente a la proteína necesaria para el mantenimiento de los animales; sin embargo, una falla en esta determinación es que frecuentemente sobreestima el valor de las proteínas de baja calidad (Campbell, 1961).

Digestibilidad (D).

La digestibilidad (D) es la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba, la cual está influenciada por la solubilidad y la susceptibilidad de la proteína al ataque enzimático, la presencia de algunos factores antinutricionales, daño durante el procesamiento de ciertos alimentos o preparación de concentrados o aislados de proteína (Altschuls, 1958).

Valor biológico (VB).

El valor biológico (VB) se mide generalmente alimentando con la proteína a prueba a ratas jóvenes como la única fuente de nitrógeno y a un nivel por abajo del requerido para mantener el balance de nitrógeno. Es medido como la proporción de nitrógeno absorbido que es retenido en el cuerpo, después de que los productos de la hidrólisis de las proteínas, los aminoácidos, han sido absorbidos y han participado en varias reacciones metabólicas en el cuerpo, incluyendo la síntesis de proteínas de los tejidos, enzimas y hormonas. Si los aminoácidos derivados de la dieta no se encuentran en las correctas proporciones, entonces los aminoácidos no utilizados son convertidos en urea y excretados por la orina. Sin embargo, existen otros compuestos nitrogenados los cuales son productos de otros procesos metabólicos, como la creatinina, el ácido úrico, sales de amonio y otros compuestos. Esto es análogo al nitrógeno fecal llamado nitrógeno endógeno. El VB es medido como la parte de la proteína dietética que es digerida y absorbida (Altschul, 1958).

UTILIZACION NETA DE LA PROTEÍNA (NPU)

Método original

Si se considera la D y se mide la retención por absorción de la proteína de prueba se estará determinando la Utilización Neta de la Proteína (NPU), el cual es igual a VB multiplicado por D. Este método toma mucho tiempo por los análisis de orina y heces. En el método descrito por Bender y Miller en 1953, para estimar el valor nutritivo de una fuente de proteína, el nitrógeno retenido se determinó midiendo directamente el contenido de nitrógeno retenido en todo el carcass (canal del animal experimental sin vísceras), nitrógeno retenido por el cuerpo del animal como una respuesta a la alimentación con diferentes fuentes de proteína. A pesar de que eliminó la necesidad de recoger y analizar heces y orina, resultó ser un método tedioso y caro.

Método simplificado

Muchos métodos han sido propuestos para evaluar la calidad de una proteína, pero actualmente necesitamos métodos rápidos, al respecto se han propuesto algunos métodos para evaluar la Utilización Neta de la Proteína (NPU) modificando el método original propuesto por Miller and Bender. En 1973, Lachance y Miller simplificaron el procedimiento empleando la concentración de nitrógeno retenido en la pierna posterior del animal, mostrando una alta correlación con la concentración de nitrógeno de todo el carcass, su utilidad residió en la simplicidad del método que expresa tanto el grado en que la proteína es absorbida (D), como el balance de aminoácidos indispensables (VB). Sin embargo, aún no resultaba ser un método práctico, además de que en este estudio únicamente se emplearon 2 dietas elaboradas con proteínas de alta calidad y 2 mezclas de aminoácidos a diferentes concentraciones. En 1978, Sotelo y Lucas desarrollaron una nueva propuesta al método original calculando el NPU usando la concentración de nitrógeno en el hígado, empleando ratas alimentadas

con dietas de diferente calidad de proteína de origen animal y vegetal durante 21 días en lugar de 28 días, encontrando una alta correlación entre el NPU calculado a partir de la concentración de nitrógeno en todo el carcass y la concentración de nitrógeno en el hígado; sin embargo, no fue posible que el NPU calculado a partir de la concentración de nitrógeno en el hígado discriminara entre las diferentes calidades de proteína de la misma forma en la que lo logró el NPU calculado a partir de la concentración de nitrógeno del carcass. Se utilizaron como fuentes de proteína: leche en polvo descremada, harina de soya, harina de trigo, harina de ajonjolí y gelatina (Lachance and Miller, 1973; Sotelo and Lucas, 1978). El presente trabajo propone la búsqueda de otros tejidos que permitan simplificar, aún más, el método original utilizando una análisis estadístico más profundo que nos permita tener una mayor discriminación en los resultados.

En la prueba del NPU, que se basa en el nitrógeno retenido por el cuerpo de un animal en experimentación como una respuesta a la alimentación de diferentes fuentes de proteínas, las ratas se alimentan con la proteína problema, con una dieta exenta de proteína durante un período mínimo de diez días, al término del cual se sacrifican y se determina su nitrógeno corporal por la técnica de Kjeldahl. La pérdida de nitrógeno corporal de los animales alimentados con la dieta exenta de proteína proporciona una indicación de la cantidad de proteína requerida en el mantenimiento antes del comienzo del crecimiento. Este índice es calculado a partir de la ganancia de nitrógeno corporal con respecto al nitrógeno corporal del grupo experimental alimentado con una dieta libre de nitrógeno. El NPU fue definido como:

$$\text{NPU} = \{ \text{Ncp} - (\text{Nc}_{\text{DLN}} - \text{N}_{\text{DLN}}) / \text{Np} \} \times 100$$

Donde: Ncp = Nitrógeno corporal del grupo de prueba.

Nc_{DLN} = Nitrógeno corporal del grupo con la dieta libre de nitrógeno.

N_{DLN} = Nitrógeno ingerido por el grupo DLN.

Np = Nitrógeno ingerido por el grupo de prueba.

Los factores que tiene importancia en el NPU son los pesos corporales de los dos grupos experimentales (de prueba y control negativo) y la proteína ingerida por el grupo de prueba. En ciertas condiciones experimentales el NPU y el NPR son determinaciones más precisas y válidas que el PER, ya que estos métodos poseen mayor sensibilidad para la lisina. Valores de NPR presentan una buena correlación con los determinados por el NPU en un amplio espectro de fuentes de proteínas. Adicionalmente, el NPU tiene mayor sensibilidad para aminoácidos azufrados. El NPU también se puede determinar de manera indirecta con los índices de valor biológico (VB) y digestibilidad (D), los resultados obtenidos por este procedimiento correlacionan bien con los obtenidos por el método clásico.

El error que se puede tener en la determinación del NPU puede ser mayor al obtenido en el PER y NPR si no se tiene una adecuada selección de los animales experimentales. El NPU es un índice que se ve afectado tanto por la digestibilidad como por la calidad de una proteína; por lo tanto, se puede considerar un índice de mayor utilidad práctica. Todas las anteriores determinaciones biológicas antes mencionadas presentan la desventaja de que se aplican a fuentes simples de proteína o a mezclas bien definidas, además de que los niveles de proteína se encuentran dentro de las necesidades preestablecidas para obtener la mejor respuesta nutritiva, en la actualidad se han descrito algunos métodos para aplicarlos en dietas que se consumen normalmente como tales y donde entran en juego otros parámetros, como lo son:

- ❖ La complejidad de las mezclas consumidas.
- ❖ La naturaleza e intervalo de alimentación.
- ❖ Efecto de procesamiento y cocinado del alimento o dieta.
- ❖ El nivel de proteína y de otros elementos nutritivos.
- ❖ El balance de la proteína con respecto a los demás elementos nutritivos (relación proteínas/ calorías).

Tomando en cuenta lo anterior, Plat y Miller propusieron alimentar a ratas con el platillo sin ninguna modificación, exclusivamente liofilizados; al mismo tiempo, Miller y Bender propusieron realizar la determinación del NPU sobre la dieta sin ninguna modificación y así denominaron a este índice como NPU operativo, adicionalmente definieron, el término Valor Neto Proteínico de la Dieta (NDpV), al producto del NPU operativo por la concentración de la proteína de la dieta, expresada en términos unitarios ($\% \text{ de proteína} / 100 = (\% \text{ N} \times 6.25 / 100 \text{ g de alimento})$).

FUENTES DE PROTEÍNA

La dependencia de una única fuente de proteína puede dar lugar a una ingesta proteínica insuficiente en algunos de los aminoácidos indispensables; por ejemplo, los cereales son deficientes en lisina mientras que las legumbres lo son en aminoácidos azufrados. Para cubrir las necesidades nutritivas, el hombre necesita una fuente de proteína diversificada y, por tanto, es mejor considerar la contribución nutritiva global de la dieta en lugar de la contribución por artículos aislados (Kay, 1979).

En los países desarrollados las principales fuentes de proteína son la leche, el pescado, los huevos, los cereales y las leguminosas. Basándose en el conocimiento de la composición en aminoácidos de las proteínas, las fuentes de proteína se clasifican en buenas, adecuadas y pobres. Las buenas son los productos lácteos, la carne, los huevos y el pescado; adecuadas los cereales y las leguminosas; mientras que las pobres son la mandioca, las papas, camotes y muchas frutas. También se han sugerido otras proteínas vegetales no convencionales como fuentes alternativas de proteína para el consumo humano, entre las que se incluyen las de semilla de algodón, las de hojas y microbianas.

Proteínas Vegetales y Animales.

Desde el inicio de la civilización y a través de la historia, los cereales han sido la mayor fuente de alimento. La humanidad ha sido asociada a la invención de un plan de cultivo desde hace 10,000 años aproximadamente. Las formas primitivas del arroz y trigo fueron los primeros cereales cultivados, junto con la cebada, sorgo, mijo, avena, centeno y maíz. La razón de esto es que muchos cereales de buenas características nutritivas, se pueden producir a gran escala de manera económica y pueden ser almacenados bajo condiciones controladas por largos períodos de tiempo (Macrae, 1993).

Hoy aproximadamente el 50% de los alimentos energéticos y el 45 % de la proteína en el mundo es suministrada por los cereales. Los cereales contienen aproximadamente 75% de carbohidratos, de 10-15 % de proteína, 2% de grasa y de 10-15 % de humedad; se pueden presentar variaciones a causa del genotipo, del medio ambiente y de las condiciones de cultivo. Los cereales más ampliamente usados son el arroz, el trigo y el maíz en Asia, Europa y América, respectivamente. En África y la India lo es el sorgo y el mijo. Los cereales aportan alrededor del 50% de la proteína consumida; sin embargo, la calidad de sus proteínas es marginal, especialmente para los niños. Además de que todos los cereales contienen relativamente altos niveles de ácido fítico, el cual liga a los minerales, taninos como en el caso del sorgo, inhibidores de tripsina y saponinas y compuestos antinutritivos (Macrae, 1993).

Las proteínas de los cereales no tiene un valor biológico alto al igual que las proteínas de leguminosas, oleaginosas y nueces, en comparación con las proteínas de origen animal. Los cereales son deficientes en lisina y presentan un bajo contenido en triptofano. Las diferencias encontradas en el contenido de leucina, valina y metionina tienen una menor significancia. Las leguminosas son una fuente vital de alimento que contribuyen al buen equilibrio nutritivo de diversas dietas humanas. Estas plantas proveen elementos nutritivos esenciales y un alto

nivel de proteína con niveles moderados de energía y fibra dietética. El término leguminosas se refiere directamente a las semillas secas y maduras de las plantas de la familia *Leguminosae*. Sólo 20 de las aproximadamente 3,000 especies son comúnmente consumidas; la mayor parte en Centro y Sudamérica, África y Asia. Se tiene una producción anual que exceden 57×10^6 toneladas por año. Estas plantas se caracterizan por contener un alto contenido de proteína y de carbohidratos; su contenido de aceite es generalmente bajo. Aunque algunos miembros son inusualmente ricos en aceite los cuales pueden considerarse atípicos como la soya y el cacahuate. Se caracterizan por tener un alto contenido en lisina (2.6-8.6%) y un bajo contenido en aminoácidos azufrados (1.0-3.3%). La utilización biológica de su proteína es medianamente baja, presenta una digestibilidad menor al 76 %, lo que puede deberse a la presencia de diversos factores antinutricionales, como las lectinas, glucósidos cianogénicos e inhibidores de tripsina, entre otros, que pueden ser removidos o destruidos durante su proceso (Macrae, 1993).

Las proteínas animales son de mayor calidad que las proteínas vegetales como alimento para monogástricos y para el hombre. Las proteínas vegetales son deficientes en lisina y en metionina. Aunque existen algunas proteínas vegetales que presentan un adecuado balance de aminoácidos, algunos aislados proteínicos no son inferiores a las proteínas animales (Macrae, 1993).

Debido a que actualmente se tiene un problema de desnutrición proteico-calórica principalmente en los países en vías de desarrollo, se ha intentado sustituir a las proteínas de origen animal por medio de la producción de proteínas de origen vegetal o subproductos de origen animal; sin embargo, es una tarea difícil ya que la composición de aminoácidos de las proteínas animales en general es muy buena, conteniendo cantidades elevadas de aminoácidos indispensables. Las proteínas de origen muscular, la leche, el huevo y los aislados de vísceras, son una excelente fuente disponible y eficaz de aminoácidos (Bourgeois y Le Roux, 1982).

DESCRIPCIÓN DE FUENTES DE PROTEÍNA UTILIZADAS

Huevo.

El huevo ha sido una importante parte de la dieta humana en la mayoría de los países alrededor del mundo por mucho años. La producción mundial se ha duplicado desde los 60's. En Europa se ha tenido el 30% de la producción mundial, seguida de Norte y Centro América y Asia. Hoy Asia tiene alrededor del 42% de la producción mundial con Europa y América, en segundo y tercer lugar respectivamente. Se producen anualmente 800,000 toneladas (Macrae, 1993).

Aunque existen factores de salud que limitan el consumo de huevo, como lo es su alto contenido de colesterol que contribuye en el desarrollo de la arteriosclerosis, el huevo es una excelente fuente de proteína de muy buena calidad. Esta compuesto por todos los componentes que la vida animal y humana requiere con excepción del ácido ascórbico. Su composición en aminoácidos es muy satisfactoria, tanto que incluso se ha considerado a la proteína del huevo (integral) como la proteína de referencia, además de que su composición en aminoácidos es muy constante, independientemente de la raza de gallinas que la produzca, la alimentación de estos animales y de la forma de producción. La deshidratación del huevo es un proceso de conservación del mismo que en ocasiones debido al procedimiento que se efectúa para su obtención se puede alterar su calidad nutritiva, debido a que se pueden presentar reacciones de Maillard (reacción entre la glucosa libre de la clara de huevo y de las proteínas, en especial con la lisina) que se pueden producir durante la conservación del polvo cuando se tienen malas condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad). Sin embargo, es posible limitar las reacciones de Maillard al eliminar antes de la deshidratación la glucosa contenida en el huevo, que puede ser mediante una fermentación bacteriana efectuada por microorganismos presentes de forma natural en la clara de huevo, fermentación con levaduras (*Saccharomices*) o por desazucarado enzimático con enzimas glucosa oxidasa.

Leche.

Históricamente, la leche proveniente de las vacas y de otros mamíferos, ha sido una importante fuente de elementos nutritivos, especialmente de proteínas para el ser humano. La leche es un complejo fluido biológico constituido por grasas, proteínas, minerales, vitaminas, enzimas y azúcar. La composición de la leche varía de acuerdo a la alimentación del animal, a la genética, al estado de lactación, la calidad nutritiva con la que es alimentado el animal, la frecuencia de la ordeña, la incidencia de enfermedades tales como la mastitis y, en general, de las condiciones ambientales. La mayoría de los cambios ocurren durante la lactación. El calostro tiene una alta concentración de grasa y proteínas (Macrae, 1993).

La leche es el alimento más completo nutritivamente hablando, que puede existir sea para el hombre o para otros mamíferos. Es un alimento completo que contiene lípidos, glúcidos, minerales, proteínas y vitaminas. Entre las proteínas de la leche, la principal es la caseína que se encuentra presente en una concentración de 25 a 27g por litro de leche, representando aproximadamente el 80% de las proteínas de la leche. Las proteínas del suero representan apenas una quinta parte de las proteínas de la leche; contiene dos fracciones principales: las globulinas que son dispersables en solución de sal diluida y las albúminas, que representan aproximadamente el 68% del total de las proteínas del suero. El principal constituyente de la fracción de lacto-albúmina de la leche se denomina beta-lactoglobulina (Charley, 1990).

Caseína.

La caseína es la principal proteína de la leche de vaca, existe en la leche en combinación con el calcio, fósforo inorgánico y citrato como una suspensión coloidal de complejas miscelas; su producción comercial tuvo lugar en el siglo veinte. La caseína comercial es una mezcla de diferentes caseínas: alfa, beta y kapa caseína. Cuando la leche se acidifica (pH 6.6) el calcio y el fósforo

inorgánico son removidos de la miscela haciendo que sean cada vez más inestables y, por lo tanto, precipite la caseína. El queso es caseinato de calcio. En 1973 la comisión de la Comunidad Económica Europea (C.E.E.) reconoció la producción de caseína alimentaria, debiendo ser usada sobre todo como aporte o como complemento de materias primas. Su empleo es primordialmente importante en la producción de quesos fundidos, en preparaciones dietéticas y en la alimentación infantil. Tiene una concentración de proteínas de 94 a 95 % de proteína en base húmeda y de 97 a 98% de proteína en base seca. Sus aminoácidos se encuentran bien equilibrados relativamente, encontrándose pequeñas deficiencias en cuanto a los aminoácidos azufrados (Bourgeois y Le Roux, 1982).

La caseína como tal tiene varias aplicaciones: en el siglo veinte y en años atrás fue usada como adhesivo, en pinturas, en fibras, en plásticos y piel. La introducción de sustitutos de crema para café por la industria alimentaria de Estados Unidos de América en 1960, logró el arraigo de la caseína como un producto alimenticio. La caseína en sus diferentes formas, es la base esencial de suministro proteínico de la alimentación infantil y constituye un complemento importante en el equilibrio proteínico de la alimentación de los adultos. La alta calidad nutritiva de la caseína que puede proveer a los alimentos no es su razón principal de uso, es incorporado a los alimentos por las propiedades funcionales que tiene (Bourgeois y Le Roux, 1982).

Aislado de soya.

La soya es originaria el lejano Oriente y ha sido una fuente de alimento para una parte del mundo por miles de años; sin embargo, sólo hace algunas décadas ha tenido importancia como alimento en el Oeste. La producción de soya se ha incrementado desde 1940. Nuevamente se ha reconocido su valor tanto del grano de soya como de su aislado proteínico. El aceite de soya es ampliamente usado en margarinas, botanas y como aderezo, mientras que la pasta residual se utiliza

para alimentación animal debido a su alto contenido de proteína. Estados Unidos de América, Brasil, China y Argentina producen el 87% de la producción mundial. Estados Unidos repuntó en los 40's, mientras que Brasil y Argentina empezaron desde los 70's. China ha sido el principal productor durante un largo tiempo. En comparación con la producción de otros granos, la producción mundial de soya es aproximadamente de 100×10^6 toneladas, mientras que la producción de otros granos como maíz y sorgo, es de alrededor 800×10^6 toneladas, en tanto que la producción de arroz y trigo es de 450×10^6 toneladas.

La soya ha sido utilizada primordialmente para la extracción de aceite en el mundo. Alrededor de la mitad de la producción de aceite proviene de la soya. El incremento en el uso de oleaginosas para la extracción de grasas para la alimentación animal y humana ha provocado un crecimiento en la producción de semillas de soya. En Estados Unidos el incremento en la producción de aceite de soya ha aumentado a un 75%. Este incremento ha repercutido en un aumento en la reproducción de pasta residual de soya ó aislado proteínico de soya. El proceso para obtener estos concentrados implica una precipitación y extracción de azúcares solubles (sacarosa, rafinosa y estaquiosa) con agua. La proteína puede precipitarse por tratamiento térmico, por adición de etanol o por modificación del pH (punto isoeléctrico 4.5). Con la extracción del agua y, por lo tanto, de azúcares complejos, la concentración de proteína puede ser del 70%, clasificada entonces como concentrado. Estos concentrados pueden ser usados en panadería y en industrias cárnicas por sus propiedades emulsificantes y humectantes (Macrae, 1993).

La proteína de soya en forma de harina o aislado proteínico es ampliamente usado para la alimentación humana. Los aislados de proteína de soya se producen en grandes cantidades a nivel industrial y su consumo compite con el uso de la harina de soya en muchas aplicaciones, a pesar de su alto precio, por su superioridad con respecto a su contenido de fibra, color y su fuerza de adhesión. El aislado de proteína es esencialmente proteína, mientras que en la harina lo es solamente en

parte (aproximadamente la mitad), es superior respecto a éste en cuanto a color, sabor, textura, viscosidad y propiedades gelificantes, es fácil y versátil en su uso y adecuada en el aspecto nutritivo. Así mismo, es asimilable ya que está libre de fibra y de inhibidores, así como de otros factores encontrados en la harina. Hasta 1948 el único producto comercial disponible era el aislado de proteína de tipo hidrolizado alcalino, el cual no era recomendado para la nutrición humana; sin embargo, en muchos ensayos fue utilizado obteniendo resultados satisfactorios y a partir de esto se consideró para la alimentación humana. Suplementado con metionina sirve como base para la alimentación, siendo una proteína vegetal al ser adecuada para el crecimiento de conejos y ratas, entre otros animales como los puercos y los chimpancés. El aislado de soya nos ofrece una buena fuente de aminoácidos indispensables para mejorar el valor nutritivo de las proteínas vegetales. Se puede realizar una fortificación con este aislado en productos tales como quesos, cremas, helados, postres congelados, yoghurt, bebidas incluyendo también a la leche; sin embargo, esto se considera como fraude o adulteración si es que no se especifica en la etiqueta (Kay, 1979).

Garbanzo.

Tiene una distribución restringida en el mundo. India y Pakistán producen y consumen el 90% de la producción mundial, el resto es producido y utilizado por algunos países del Mediterráneo y América Latina. Turquía, Etiopía, Marruecos y Algeria también son importantes productores. México es importante productor de garbanzo, a pesar de que el 80% del mismo es destinado a la exportación; buena parte de la producción proviene del norte de los estados de Sinaloa y Sonora, ya que para su cultivo requiere de climas fríos a templados y de altas altitudes en los trópicos y subtropicos (Sotelo, 1981; Macrae, 1993).

Los garbanzos son del género Caucásico, de la familia *Leguminosae*. Puede variar considerablemente de tamaño y peso, se utiliza como un vegetal rico en vitaminas. En Asia los vástagos frescos de las plantas jóvenes se utilizan como

un vegetal similar a las espinacas. Los garbanzos completamente maduros presentan un contenido de proteína de aproximadamente 17%, los constituyentes del garbanzo varían con el grado de maduración de la semilla, de acuerdo a estudios realizados se ha visto que el valor nutritivo del garbanzo aumenta con la madurez. La composición de los garbanzos varía de acuerdo a las características del terreno en el cual se cultivan y por las condiciones climáticas, por lo que su contenido de proteína varía entre 12.3 y 31.6%. Son fuente rica de carbohidratos complejos y fibra dietética, también son fuentes significativas de fósforo, calcio, magnesio, potasio, vitaminas del complejo B y tienen un bajo contenido en sodio. Los garbanzos son un producto alimenticio nutritivo y de sabor suave, son útiles para incorporarlos en mezclas alimenticias ricas en proteínas, adecuada para la alimentación infantil. Sin embargo, son deficientes en aminoácidos azufrados y triptófano (Kay, 1979; Sotelo, 1981).

Lenteja.

Pertenece a la familia *Leguminosae*, son las semillas de leguminosas más antiguas que se utilizan como alimento para el género humano. Se presume su origen en Asia menor, extendiéndose rápidamente a Egipto, Europa central y meridional, Etiopía, Afganistán, Norte de la India y Pakistán, actualmente se producen en Estados Unidos, México, Chile, Perú, Argentina y Colombia. Crece en climas fríos en la región del mediterráneo y del cercano oriente donde son cocinados como los chicharos y los frijoles. Las lentejas son un producto alimenticio que se utiliza como ingrediente de sopas, presenta un contenido de proteína de aproximadamente de 25%. Existen variaciones por las diferentes condiciones climáticas y de cultivo, dando una variación del 17 al 30% de proteína. Las semillas secas son una excelente fuente de proteínas, fibra dietética y carbohidratos complejos, así como de calcio, fósforo, magnesio, potasio y vitaminas del complejo B, pero tienen un bajo contenido de sodio. Las semillas verdes son buenas fuentes de vitamina C. Cerca del 50% de la proteína en la semilla esta compuesta por globulinas y sus proteínas son ricas en lisina.

Sin embargo, los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y el triptófano son el primer y segundo aminoácido limitante, respectivamente. El porcentaje del total de los aminoácidos indispensables en estas semillas varía de 8.4 a 10.6 % sin considerar la humedad (base seca). Comparando las proteínas de la lenteja y la soya, las proteínas de la lenteja son generalmente de baja calidad, pero contienen una menor cantidad de inhibidores de tripsina y fitohemaglutininas activas que son fácilmente destruidas por un tratamiento térmico. Las lentejas sólo cuentan con una producción mundial del 2% de la producción de leguminosas, cerca de la mitad de esta producción proviene de la India y Turquía, son cosechas de leguminosas importantes por su contenido de proteína relativamente alta y por la facilidad con la que se digieren (Macrae, 1993).

Ajonjolí.

El ajonjolí es una de las semillas más antiguas cultivada por el hombre. Su aceite, harina y sus semillas han servido como base de la alimentación de la gente asiática por muchas generaciones. Ha sido cultivada en África, Asia menor, China, Mauritania, Japón y en algunas regiones de Europa Central, a partir de los años 30's se empezó a cultivar en Sudamérica, América central y México. Originalmente el ajonjolí fue introducido a Estados Unidos por la emigración negra proveniente del este de África. El ajonjolí, *Sesamun indicum*, pertenece a la familia *pedialaceae*, la cual consta de 16 géneros y 6 especies generalmente encontradas en zonas tropicales y subtropicales. Estudios realizados con animales (pruebas biológicas) resaltaron que el ajonjolí presenta una deficiencia como fuente de proteína ya que es deficiente en lisina (Altschul, 1958).

Trigo.

Por 10,000 años el trigo ha sido objeto de particular interés, en especial por su valor nutritivo, así como por su fácil cultivo y almacenamiento. El trigo constituye una tercera parte de la producción mundial de cereales, esta producción al final de

los 80's excedió las 550×10^6 toneladas. El 90 % de la producción es utilizada para la alimentación humana, provee el 20 % de la energía consumida por el hombre, ésta es consumida como pan principalmente. Existen alrededor de 20 especies y varios miles de variedades. La especie más importante es *Triticum aestivum* subsp. *vulgare* y el trigo duro *T. durum*, económicamente hablando. El área global de cultivo del trigo cubre 240×10^6 hectáreas y aproximadamente el 90 % de esta superficie es ocupada por el *T. aestivum*. Las áreas de cultivo de trigo son localizadas en el hemisferio norte principalmente.

La composición química del grano de trigo y de sus partes anatómicas esta determinada por condiciones genéticas y ecológicas (clima, suelo, etc.), así como por los efectos químicos y físicos que ocurren dentro del grano durante su almacenamiento y proceso. El principal componente del trigo es el almidón. Las proteínas son la principal base nutritiva del grano; su cantidad y su calidad esta determinada por la aplicación del grano y de sus productos. Las sustancias proteínicas del trigo son divididas con base en su solubilidad (albúmina, globulinas, prolaminas y gluteninas). Sus proteínas son deficientes en lisina, pero contiene cantidades apreciables de ácido glutámico y prolina. La grasa es el tercer componente del trigo. Su procesamiento en harina conlleva un decremento en su valor nutritivo debido a la oxidación de los carotenoides. Las proteínas del trigo han sido estudiadas exhaustivamente por la importancia que representa el glúten. El glúten está compuesto de dos fracciones: gluteninas soluble en álcali y gliadinas soluble en solución acuosa de alcohol. Además el trigo contiene cantidades significativas de albúmina, leucosina y globulinas. Su valor nutritivo también esta determinado por su bajo contenido de lisina, metionina y triptofano. El grano de trigo presenta un pobre contenido de vitaminas, solo las vitaminas del grupo B están presentes en cantidades significativas. Su bajo contenido de grasa tiene un papel significativo en el valor nutritivo tanto de la harina de trigo como de sus productos (Macrae, 1993).

Sorgo.

La producción total de sorgo (*Sorghum bicolor*) esta clasificada como el quinto de los principales cereales, con 59×10^6 toneladas en 1987. La producción de sorgo es alta en Estados Unidos, México, Nigeria, Sudán, Etiopía, India y China. Pero también se produce en otros países. La mayoría de los países de África y Asia utilizan al sorgo como fuente de alimentación, forraje, combustible y material de construcción. En el hemisferio Este, el sorgo es utilizado como alimento y forraje principalmente. Especiales tipos de sorgo se utilizan como cereal. El sorgo es originario del Noreste de África, pertenece a la familia *Gramineae*, subfamilia *Panicoideae* y tribu *Andropogoneae*. Es de climas cálidos, es una semilla de estación intolerante a bajas temperaturas. Es clasificado de acuerdo al color de su pericarpio (blanco, amarillo o rojo), presencia o ausencia de pigmentación en la cabeza (presencia o ausencia de taninos), color del endosperma (amarillo, blanco o heteroamarillo), tipo de endosperma, etc. Estas características son genéticamente controladas (Macrae, 1993).

La composición del grano de sorgo varía significativamente de acuerdo a su propia genética o a influencias ambientales. Su mayor componente es el almidón (75-79 %), seguido de proteínas (9-14.1%) y aceite (2.1-5.0%). Su contenido de proteína es más variable y usualmente más alto que el de maíz (1-2%). Aproximadamente el 80, 16 y 3% de la proteína esta en el endospermo, germen y pericarpio, respectivamente. Generalmente contiene menos del 1 % de aceite que el maíz. La principal porción de proteínas son las prolaminas, seguidas de la glutelinas. La mayoría de la fibra se encuentra localizada en las paredes celulares y en el pericarpio. El germen y la capa de aleurona son los principales contribuyentes de la fracción lipídica, donde están concentrados, al igual que en el pericarpio, la mayoría de los minerales. Es rico en fósforo y potasio pero pobre en sodio. Todo sorgo contiene ácido fenólico y la mayoría contiene flavonoides. Sólo el sorgo café contiene grandes cantidades de taninos. El sorgo tiene una composición aproximada en aminoácidos y valor nutritivo a la del maíz. Sin embargo, tiene un

bajo contenido de grasa, presenta baja digestibilidad y energía metabolizable. El malteado y la fermentación aumentan su valor nutritivo significativamente. El sorgo café tiene un bajo valor nutritivo aún sin contener taninos, los cuales ocasionan una baja digestibilidad de las proteínas y una deficiente alimentación. La lisina y la treonina son el primero y segundo aminoácido limitante, respectivamente (Macrae, 1993).

Gelatina.

La gelatina es un producto obtenido por la hidrólisis parcial de la colágena presente en la piel, tejido conjuntivo blanco o huesos de los animales, principalmente de ganado vacuno y porcino. El principal uso de la gelatina es como agente gelificante y secante, o en altas concentraciones, como gel. Es el principal agente gelificante utilizado en la industria de alimentos porque es relativamente barato y se produce en grandes cantidades. El 14to. reporte del Comité Mixto FAO/OMS, Ginebra (1970), reporta que "... la gelatina es la proteína que constituye un alimento si se obtiene en buenas condiciones de fabricación...". En cuanto a su composición química, se diferencia de las demás proteínas animales por su alto contenido de glicina (33%) y de prolina e hidroxiprolina (22%), que son aminoácidos cíclicos a los cuales se les atribuye un papel importante en la rigidez de la gelatina. La gelatina contiene 19 de los aminoácidos siendo muy notoria la ausencia de triptófano, que impide que la gelatina se le pueda nombrar como alimento proteínico completo, por lo que se le considera como la única proteína de origen animal de mala calidad alimenticia. Existen diferentes tipos de gelatina comercialmente disponibles: la obtenida de los huesos (oseína) y de la piel de bovinos y porcinos. Es extraída de la colágena por una hidrólisis ácida o alcalina controlada. La fuente, la edad y tipo de colágena influyen las propiedades de la gelatina derivada de ella (Macrae, 1993).

M E T O D O L O G Í A

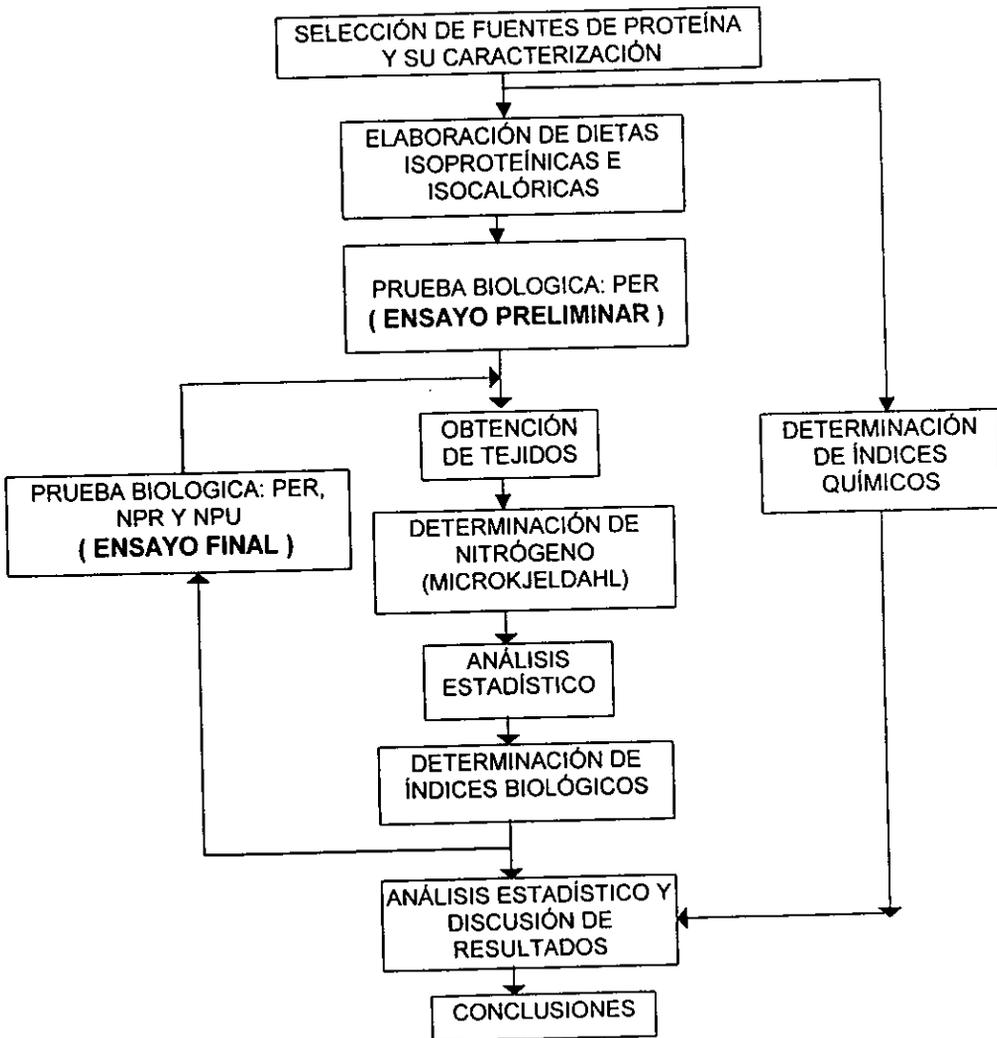


FIGURA 1. DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

La figura 1 nos muestra el diagrama del trabajo experimental que se siguió, dándose posteriormente detalles del mismo. La figura 2 señala los pasos que se siguieron para llevar a cabo la caracterización de las fuentes de proteína, es decir, su análisis proximal, su contenido de aminoácidos y, por último, su contenido calórico.

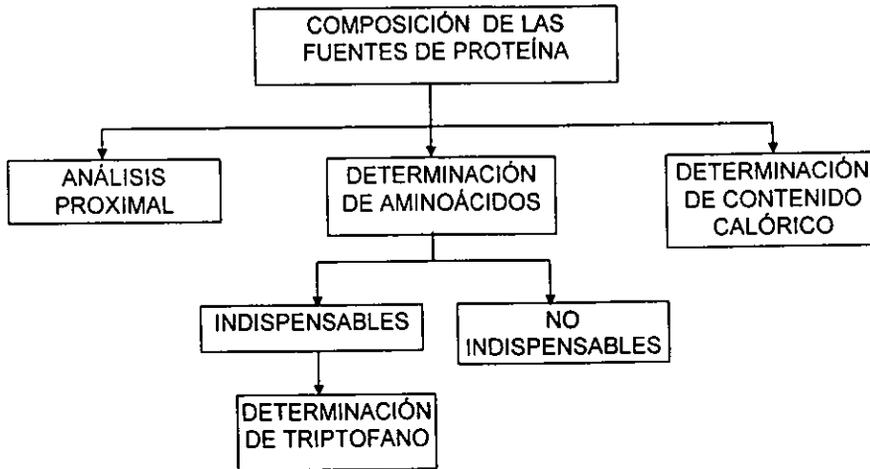


FIGURA 2. CARACTERIZACIÓN DE FUENTES DE PROTEÍNA.

SELECCIÓN DE FUENTES DE PROTEÍNA

Para obtener el mayor rango de calidad de proteína se seleccionaron diferentes fuentes de proteína (tabla 5). Se consideró el huevo y la gelatina como límite superior e inferior, respectivamente. La caseína se tomó como referencia. En total se analizaron diez fuentes.

TABLA 5. FUENTES DE PROTEÍNA.

FUENTE	CALIDAD NUTRITIVA	ORIGEN	OBSERVACIONES
Huevo	Buena	Animal	Huevo entero deshidratado en polvo "Campeón". Alimentos Deshidratados, S.A. de C.V.
Leche	Buena	Animal	Leche entera en polvo "Nido". Nestlé, S.A. de C.V.
Caseína	Buena	Animal	Caseína de leche bovina. Sigma Chem. C.O. # 3400
Soya	Media	Vegetal	Aislado de proteína de soya "Suproplus® 651. Protein Technologies International.
Garbanzo	Media	Vegetal	"El Labrador". Adquirido en tienda de autoservicio.
Ajonjolí	Baja	Vegetal	Universidad Autónoma de Nayarit (Pasta residual de ajonjolí).
Trigo	Baja	Vegetal	Municipio de Jilotepe, Estado de México.
Lenteja	Baja	Vegetal	"San Lázaro". Adquirido en tienda de autoservicio.
Sorgo	Baja	Vegetal	Municipio de Jilotepec, Estado de México.
Gelatina	Baja	Animal	Gelatina comercial.

ANÁLISIS PROXIMAL

Para llevar a cabo una evaluación en el aspecto nutritivo de una fuente de proteína, es necesario elaborar una dieta isoproteínica e isocalórica con respecto a la dieta de referencia (caseína), considerando como única variable el origen de la proteína; por lo tanto, es necesario diseñar una dieta adecuada. Para llevar a cabo lo anterior, fue indispensable caracterizar (análisis proximal, contenido calórico y contenido de aminoácidos) cada una de las fuentes seleccionadas para poder ajustarlas a nuestra dieta de referencia y hacer las comparaciones pertinentes (Helrich, 1990; Iruegas, 1973). Contando con las cantidades suficientes de cada una de las fuentes de proteína y tras su adecuado acondicionamiento a harina, se tomaron muestras homogéneas y representativas de cada una y se procedió a realizar su análisis proximal (figura 3).

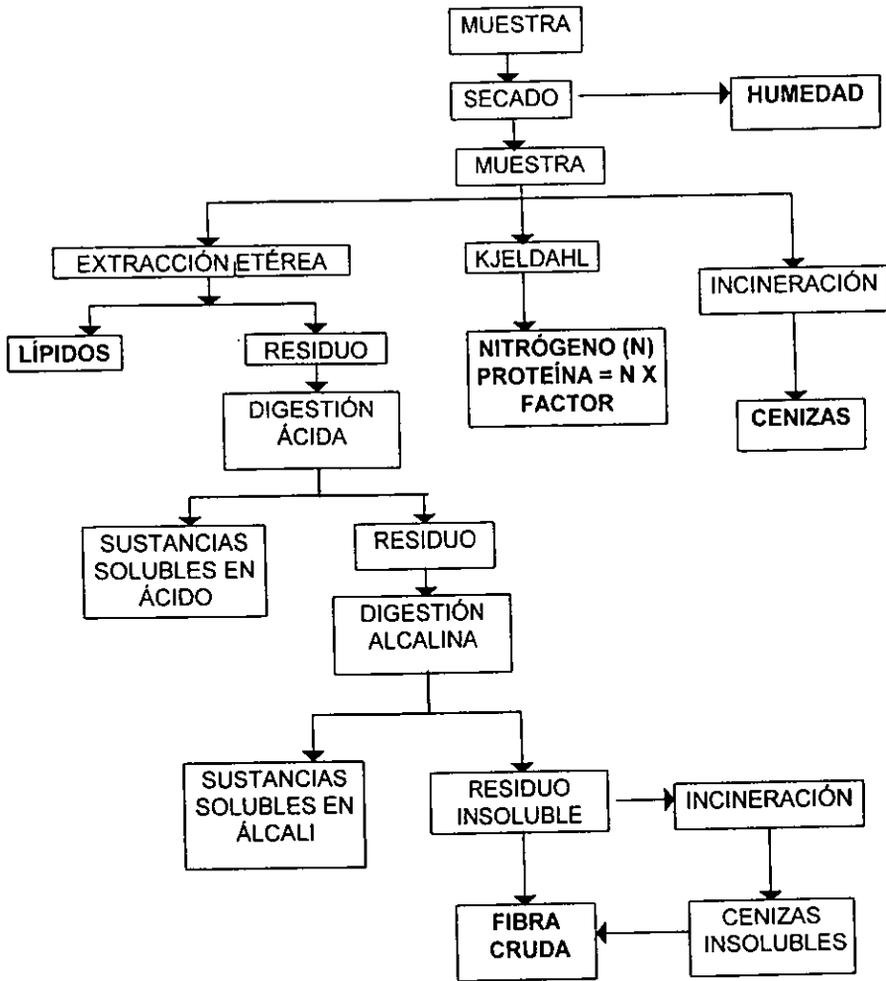


FIGURA 3. ESQUEMA WEENDE DE ANÁLISIS.

Fundamento:

El análisis proximal o sistema analítico Weende, se desarrolló en Alemania hace más de cien años, en la estación experimental que lleva su nombre. Este sistema se ha criticado mucho, pero hasta la fecha nadie ha desarrollado otro mejor que

sea tan práctico y aceptable. Este tipo de análisis se emplea en todo el mundo para hacer descripciones de los alimentos y la mayoría de los requisitos legales para productos alimenticios se basan en el sistema Weende (Helrich, 1990). El análisis proximal se realizó de acuerdo al esquema de Weende (figura 3) con algunas modificaciones en el material recomendado según los métodos de la A.O.A.C. (Helrich, 1990).

Las modificaciones fueron las siguientes:

- En la determinación gravimétrica de humedad se empleó una estufa de presión reducida (vacío) LAB-LINE DUO-VAC a 15 in/Hg. Mod. 3620 y una temperatura de 60-65°C, hasta peso constante.
- Se utilizó el digestor Tecator Model a/ b 20/40 (Serie 254) y el autoanalizador KJELTEC 1030 (Serie 13417) para la determinación de proteína.
- Para la cuantificación de fibra se utilizaron filtros California de polietileno. Labconco, 200-mesh stainless steel 5214-A10 y diámetro interno de 76 mm.

ELABORACIÓN DE DIETAS

Para la elaboración de las dietas experimentales fue necesario hacer un ajuste de los macronutrientes de la fuente de proteína. Se manejó un nivel de 10% de proteína para todas las dietas, como el valor más y un contenido calórico de 430 Kcal / 100 g (densidad calórica = 4.3) adecuado (Hurt, 1975; Corbin, 1976).

Material:

- Balanza granataria y analítica.
- Vaso de precipitado de 150 ml y pipeta graduada de 5 ml.
- Mortero con pistilo.
- Mezcladora.
- Recipientes de plástico para guardar las dietas y etiquetas.

Ingredientes:

Los ingredientes empleados para la elaboración de dichas dietas fueron:

TABLA 6. INGREDIENTES DE LAS DIETAS.

INGREDIENTE	OBSERVACIONES
Fuente de proteína	Ver tabla 5.
Aceite de maíz	Marca comercial "Maizola".
Mezcla de sales	INC Pharmaceuticals. Catálogo.
Mezcla de vitaminas	INC Pharmaceuticals. Catálogo.
Celulosa	INC Pharmaceuticals. Catálogo.
Agua	Agua destilada "Electropura".
Almidón de maíz	Marca comercial "Maizena", fécula de maíz.

Procedimiento:

A partir del análisis proximal de cada una de las fuentes, se ajustaron las dietas a un mismo nivel de proteína (10%) y contenido calórico (430 Kcal / 100 g), empleando las fórmulas que se muestran en la tabla 7.

TABLA 7. DIETA BASAL.

INGREDIENTE	FORMULA ¹
Fuente	$Y = 1.6 \times 100 / \%N \text{ de la fuente}$
Aceite de maíz	$8 - (Y \times \%grasa / 100)$
Mezcla de sales	$5 - (Y \times \%cenizas / 100)$
Mezcla de vitaminas	1
Celulosa	$1 - (Y \times \%fibra \text{ cruda} / 100)$
Agua	$5 - (Y \times \%humedad / 100)$
Almidón	c.c.p. 100

1) Fórmulas para preparar 100 g de dieta, base húmeda.

Cada una de las fuentes secas, molidas y tamizadas se homogenizaron junto con todos los ingredientes sólidos, excepto las vitaminas. Enseguida se adicionó el aceite y, por último, la mezcla de vitaminas manteniendo la dieta en la mezcladora hasta su completa homogenización. Todas las dietas se guardaron en recipientes de boca ancha, perfectamente identificados y cerrados, en refrigeración (Helrich, 1990).

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO CALÓRICO

Fundamento:

Para obtener el contenido calórico, se somete una fracción de la muestra a una combustión total, dentro de un recipiente cerrado y en presencia de un exceso de oxígeno que asegure una completa combustión. En el caso específico de la bomba calorimétrica Gallenkamp, la elevación de la temperatura por efecto de la combustión, es detectada por un termopar, el cual a su vez está acoplado a un galvanómetro de alta sensibilidad, produciéndose una deflexión que se traduce en una lectura, la cual, al interpolar en una curva patrón previamente establecida de un material de densidad energética conocida, proporcionará su valor calórico. El anterior dispositivo pertenece al grupo de calorímetros, denominado calorímetro de medición de un incremento de temperatura temporal.

Material y reactivos:

- Balanza analítica.
- Bomba calorimétrica Gallenkamp.
- Galvanómetro GAM METRIC LTD.
- Crisoles de acero inoxidable de 2.54 cm de diámetro.
- Mango metálico prensador.
- Mechas de algodón de 7 cm de longitud.

- Ácido benzoico (estándar termoquímico de la British Chemical Standard; valor calórico de 26,454 Joules/g ó 6.3184 Kcal / g).
- Tanque de oxígeno grado industrial.

Procedimiento:

Las muestras se molieron finamente (aún cuando el secado es conveniente, éste depende de las características propias de la muestra). La cantidad de muestra se determinó por el tipo de material. Como referencia se pesó una cantidad de muestra que proporcionó aproximadamente 4 Kcal. Para materiales de alta densidad calórica es suficiente 0.4g, mientras que para muestras de baja densidad calórica, como la urea por ejemplo, se requiere de 1.5g.

Dentro del crisol, se colocó una cantidad de muestra ligeramente superior a la deseada, junto con la mecha de algodón con aportación calórica conocida. A continuación se compactó la muestra y la mecha con el mango metálico prensador y se tomó el peso definitivo (cuando se trata de grasas se pesa exactamente la cantidad de muestra requerida y la determinación se debe hacer rápido para evitar que la muestra suba por capilaridad y se moje la mecha al grado de que gotee fuera del crisol). El crisol se colocó en la parte superior del pilar central de la bomba y el extremo de la mecha se introdujo en el alambre de ignición. Se tuvo cuidado de que el anillo sellador de la bomba se hallara en perfectas condiciones y flexible; en caso contrario se aplica un poco de grasa o, dado el caso, se reemplaza. Se colocó el anillo sellador en el canal circular, se levantó el anillo estriado y enroscó el cilindro de la bomba junto con el anillo estriado sobre el anillo asegurador y se terminó de girar el cilindro hasta que se cerró completamente. Se introdujo la terminal del termopar en la parte superior del cilindro de la bomba.

Se abrió el tanque de oxígeno, previo ajuste de la válvula de reducción de flujo. Se giró la perilla de paso de oxígeno en el panel de control de la bomba y se dejó

abierta hasta que se tuvo una presión dentro del cilindro de 25 atmósferas. De no llegar a esta presión, se ajusta de nueva cuenta la válvula de reducción o se verifica el contenido de oxígeno en el tanque. Se cerró la perilla de paso de oxígeno y se cuidó que no hubiera reducción en la presión, lo cual indicaría la existencia de una fuga en alguna de las conexiones.

Se dejó que la temperatura del termopar se estabilizara con respecto a la del cilindro. Se ajustó la escala en el galvanómetro a cero con el ajuste fino (perilla central). Se verificó que la válvula del lado derecho de la base del cilindro se hallara cerrada. Se presionó el botón rojo de ignición en el panel central de la bomba y se esperó a que se iniciara la combustión, lo cual se vio por una notable deflexión de la aguja del manómetro. La lectura en el galvanómetro llega a un máximo, después de lo cual baja un poco para volver a subir hasta estabilizarse en una lectura máxima durante unos momentos. Esta última lectura es la que se toma. Se abrió la válvula del lado derecho de la base del cilindro de la bomba para dejar escapar los gases producto de la combustión y se quitó el termopar y el cilindro de la bomba en forma inversa a la descrita anteriormente. Se enfrió el cilindro de la bomba a chorro de agua y se enjuagó con agua destilada. Se secó para la siguiente determinación. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Cálculos:

Se elaboró una curva patrón con ácido benzoico de densidad calórica conocida. Se recomienda tener suficientes puntos en la curva de modo que se cubra toda la escala en el galvanómetro (0.1 a 0.8 g). Se realizó una gráfica colocando en las abscisas el contenido energético (Kcal) y en las ordenadas la lectura en el galvanómetro. El contenido energético del ácido benzoico se obtuvo a partir de las equivalencias que más adelante se muestran. Se realizó la combustión exclusivamente de la mecha empleada de modo que posteriormente se hiciera la corrección en la lectura de las muestras (el valor de la mecha en el galvanómetro fue aproximadamente de 0.2) (Molinar, 1988).

Por interpolación a partir de la curva patrón se determinó el contenido calórico de las muestras considerando lo siguiente:

1 g ácido benzoico = 26,254.3 J

1 g ácido benzoico = 6,270.7 cal

1 Kcal = 4.1868 KJ

DETERMINACION DE AMINOÁCIDOS

Fundamento:

La determinación cuantitativa de los aminoácidos de una proteína guarda una estrecha comparación a lo que se realiza en el análisis químico elemental de una simple molécula orgánica; es decir, una característica primaria cuando se tiene una proteína es determinar su composición de aminoácidos. La cromatografía de intercambio iónico con resinas específicas (resina de poliestireno sulfonatada), acoplada a bombas especiales que mantienen un flujo constante de las soluciones eluyentes y aparatos de registro electrónico automático, han permitido el desarrollo de los autoanalizadores de aminoácidos. El método particular de hidrólisis de proteínas previo a el análisis de aminoácidos, es de considerable interés, debido a que ciertos aminoácidos son destruidos y la liberación de otros es incompleta. La hidrólisis ácida es el procedimiento generalizado disponible para la gran variedad de proteínas; es costumbre tratar la proteína con 2.5 a 5,000 veces su peso con HCl 6N y mantener la solución bajo reflujo por espacio de 18 a 24 horas.

En la actualidad, el método propuesto por Mooore y Stein es el recomendado y es la técnica clásica de hidrólisis ácida de una proteína para la cuantificación de aminoácidos; sin embargo, el procedimiento que se utilizó usó la modificación del

tiempo y temperatura de $145^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4 horas, para su posterior purificación y separación por cromatografía de intercambio iónico (Sotelo and Lucas, 1982).

Material y reactivos:

- Microjeringa Hamilton Modelo 1001-LTN.
- Membrana Millipore. Cat. No. GVHP 01300. Tipo GV. Tamaño de poro $0.22 \mu\text{M}$.
- Adaptador para filtración en jeringa Millipore XX30-012-00
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYREX No. 9826.
- Equipo: Technicon Aminoacid Autoanalyzer System NC-2P. (Serie 29367) y colorímetro: Autoanalyzer II (Serie DCE 17620).
- Potenciómetro Corning Model 10 (Serie D44676).
- Digestor Tecator Model a/b 20/40 (Serie 254) y rotavapor Buchi Model R.
- Parrilla de calentamiento y agitación Model PC-320 (Serie 868830).
- HCl 6N.
- Metilcelosolve al 50%.
- Amortiguador de acetato de sodio 4N (a).
- Sulfato de hidracina (b).
- Ninhidrina (c).
- Solución lavadora (d).
- Amortiguador de dilución (e).
- Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución (f).
- Hidróxido de sodio 0.1N (f).

Elaboración de reactivos:

- a) Se colocó aproximadamente 3 litros de agua desionizada en un dispositivo de agitación, se adicionó 1,312 g de acetato de sodio anhidro y para prevenir la cristalización se adicionó lentamente y con ayuda de calentamiento para su

completa solubilización. Una vez fría la solución se añadió 400 ml de ácido acético glacial lentamente y se dejó enfriar. Por último, se llevó a un aforo de 4 litros previo ajuste del pH a 5.55 ± 0.02 (Nota: para el ajuste del pH se usó álcali o ácido concentrado ya que 4g de NaOH apenas incrementan dicho amortiguador en 0.04 unidades de pH).

- b) Se disolvieron 1.049 g de sulfato de hidracina en agua destilada y desionizada, a continuación se adicionó 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado (R.A.) y 30 ml de solución de Brij-35 al 20%. Se llevó esta solución a un volumen de 4 litros; para su conservación se adicionó 0.8 ml de ácido caprílico como conservador.
- c) Se disolvió 40g de ninhidrina en 2 litros de metilcelosolve, a continuación se adicionó lentamente 1 litro del amortiguador de acetato de sodio 4N. Por último, se llevó a un volumen de 4 litros.
- d) Solución lavadora: Agua/Etanol (3:1; v/v), con hidroquinona al 0.01% como agente antioxidante.
- e) Se preparó una solución de ácido clorhídrico 0.2N (A) y una solución de cloruro de sodio 0.2M (11.69 g/l) (B). Se tomaron 50 ml de (A) y 33.3 ml de (B), se llevó a 200 ml con agua desionizada adicionando hidroquinona al 0.01%. El pH de este amortiguador debe ser de 1.50 ± 0.05 , sino se ajusta.
- f) Amortiguadores para la corrida del hidrolizado ácido de una proteína.

Preparación de soluciones amortiguadoras:

- 1) En un recipiente con agitación se colocó la mitad del volumen de agua desionizada (0.5 litros) y se disolvieron todos los componentes sólidos (sales).
- 2) Después se adicionaron los reactivos líquidos o las soluciones correspondientes, a excepción del ácido caprílico, el cual se adicionó hasta después de ajustar el pH.
- 3) Una vez disueltos todos los reactivos en la mitad del volumen, se procedió a adicionar más cantidad de agua hasta llevar a un volumen aproximado de 900 ml con el fin de tener margen para ajustar el pH.

- 4) Se ajustó el amortiguador al pH deseado con la ayuda de un potenciómetro de escala expandida; el cual se calibró previamente con un buffer de referencia (pH=4.00 ± 0.02).
- 5) Una vez ajustado el pH, el volumen se llevó en un matraz volumétrico de 1 litro con la ayuda de unas gotitas de ácido caprílico para romper la espuma formada.
- 6) El amortiguador ya ajustado y aforado se filtró a través de papel filtro Whatman No. 542 con ayuda de vacío, con la finalidad de eliminar cualquier partícula extraña, ya que estas soluciones pasarían a través de la resina de intercambio iónico.
- 7) En el recipiente final del amortiguador se adicionó la cantidad especificada de ácido caprílico como conservador y a continuación se vació el amortiguador ya aforado y filtrado a dicho recipiente. Finalmente se montó en el aparato.

TABLA 8. ELABORACIÓN DE AMORTIGUADORES E HIDRÓXIDO DE SODIO.

REACTIVO ANALÍTICO	BUFFER #1 ¹	BUFFER #2 ²	BUFFER #3 ³	NaOH 0.2N ⁴
Acetato de sodio (anhidro)	4.1 g	4.5 g	87.0 g	---
Acido acético glacial	20.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	---
Solución de acetato de zinc	---	1.2 ml	2.0 ml	---
Alcohol etílico absoluto	78.0 ml	80 ml	---	---
Alcohol benzílico	---	---	11.0 ml	---
Hidroquinona (antioxidante)	0.11 g	0.11 g	---	---
Solución BRIJ-35 al 20%	8.0 ml	8.0 ml	8.0 ml	---
EDTA (Sal disódica)	0.1 g	---	---	1.0 g
Hidróxido de sodio (lentejas)	---	---	---	8.0 g
Acido caprílico (conservador)	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	---
Agua destilada y desionizada	1.0 l	1.0 l	1.0 l	1.0 l
pH	4.00±0.02	4.10±0.02	5.40± 0.02	
Concentración de Na ⁺ (M)	0.05 M	0.06 M	1.06 M	0.20 M
Concentración de Zn ⁺⁺ (M)	0.00 M	3.0 X 10 ⁻⁴ M	1.0 X 10 ⁻³ M	0.00 M

- 1) Regeneración de la resina. 2) Elución de a.a. ácidos y neutros. 3) Elución de a.a. básicos. 4) Lavar la resina.

Procedimiento:

Se pesó dentro del tubo de hidrólisis la cantidad de muestra finamente molida y desengrasada (siempre y cuando el contenido de grasa sea mayor al 5.0%), según la fórmula que a continuación se muestra. Se adicionó con mucho cuidado la cantidad de ácido requerida con ayuda de una bureta, tratando de que toda la muestra se humedeciera con el reactivo de hidrólisis. En este paso se realizó la modificación de adicionar 100 mg de fenol por 100 ml de ácido añadido (0.1%).

$$A = (0.05 \times 100) / \%P$$

$$B = (4 \times 100) / \%P$$

Donde: A = Muestra, en gramos.

B = HCl 6N, en ml.l

%P = Proteína en la muestra, en %.

Se insufló nitrógeno de alta pureza y se cerró perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. Se colocó en el digestor a una temperatura de $145 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 4 horas (contadas a partir del momento en que se colocó en el digestor que ya debe estar a la temperatura indicada). Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se dejó enfriar el tubo y se filtró en büchner y matraz kitasato, con vacío (Papel Whatman No. 52) para eliminar residuos carbonizados, se lavó con el menor volumen posible de solución lavadora.

Se trasvasó el volumen a un matraz bola y se colocó en el rotaevaporador. La evaporación del ácido se realizó en una hora máximo a una temperatura menor de 80°C (la relación tiempo/temperatura es muy importante, lo ideal es corto tiempo alta temperatura) y se evaporó hasta sequedad para eliminar la mayor parte de HCl en exceso y facilitar la neutralización. Se evaporó una sola vez. Con un volumen máximo de 20 ml de solución lavadora se lavó el matraz bola y se pasó a un vaso de precipitados de 25 ml, con agitación constante. Con la ayuda de un potenciómetro se neutralizó a un pH de 6.8 ± 0.2 adicionando gota a gota NaOH

5.0 N (cuando se estuvo cerca del punto de neutralización se diluyó un volumen pequeño de NaOH con agua desionizada). No se debe rebasar el volumen de 25 ml durante la neutralización.

Ajustado el pH se aforó a 25 ml y se filtró de nuevo (el hidrolizado se guarda en congelación sólo cuando no se inyecta el mismo día); para inyectar el hidrolizado en el autoanalizador se diluyó con amortiguador de dilución (Buffer pH=1.50±0.02 con hidroquinona al 0.01%) en una proporción de 1:1 (o sea que el aforo real del hidrolizado fue de 50 ml). Esta dilución se filtró una parte a través del dispositivo Millipore. Se descartaron las cinco primeras gotas del filtrado y el resto se utilizó para inyectar en el autoanalizador de 100 a 200 µl.

Condiciones del equipo y de la corrida (para estándar y muestras):

Para verificar las condiciones del equipo se corrió un estándar de aminoácidos, mientras que las condiciones de la corrida (para estándar y muestras) fueron:

- Resina BIO-RAD AMIDEX A-9 altura de 410 mm.
- Buffer:
 - a) No. 1 según manual, pH = 4.00 ± 0.02
 - b) No. 2 según manual, pH = 4.10 ± 0.02
 - c) No. 3 según manual, pH = 5.40 ± 0.02
- Bomba peristáltica = flujo de 0.63 ml / min (20.5 U).
- Temperatura de la columna = 60 ± 0.5°C.
- Temperatura del baño de reacción = 89 ± 0.5°C.
- Sensibilidad del registrador = 2.5 U.

Cálculos:

En los aminogramas tanto del estándar como de las muestras, el área de los aminoácidos se asemeja a un triángulo, por lo que se calcula en forma similar:

$$\text{Área} = \text{base} \times (\text{altura} / 2)$$

Los cálculos se realizaron como a continuación se describe, llevando a cabo el control de los datos mediante una hoja de anotación (Apéndice I: Determinación de aminoácidos) y poder sacar la información de una manera rápida y fácil:

- Se identificaron los picos correspondientes a cada uno de los aminoácidos en el estándar y en las muestras, por su tiempo de retención.
- Se calculó el área bajo la curva de cada uno de los picos correspondientes a los aminoácidos, tanto en el estándar como en las muestras.
- Se determinaron los gramos del aminoácido correspondiente (aa_i g):

$$aa_i \text{ g} = (Aaam \times \mu\text{Me} \times \text{P.M.}) / (Aaae \times 10^6)$$

Donde: $Aaam$ = Área del aminoácido correspondiente en la muestra, en mm^2 .

$Aaae$ = Área del aminoácido correspondiente en el estándar, en mm^2 .

μMe = Micromoles del aminoácido correspondiente en el estándar.

P.M. = Peso molecular del aminoácido correspondiente, en $\mu\text{g} / \mu\text{mol}$.

- Se determinaron los miligramos del aminoácido correspondiente por gramo de nitrógeno (aa_i mg / g N):

$$aa_i \text{ mg / g N} = (aa_i \text{ g} \times A \times 1000) / (a \times \text{gN})$$

Donde: aa_i g = gramos del aminoácido correspondiente.

A = Aforo, en ml.

a = Alícuota (inyección al autoanalizador), en ml.

gN = Nitrógeno en la muestra, en gramos.

DETERMINACIÓN DE TRIPTOFANO

Fundamento:

Debido a que la hidrólisis ácida (que se usa comúnmente para la determinación de la mayoría de los aminoácidos de una proteína), destruye completamente el triptofano, se hace uso de la hidrólisis alcalina. En la actualidad ésta ha quedado restringida para el caso particular del triptofano y tirosina. Aunque se ha reportado una gran variedad de reactivos para llevarla a cabo dicha hidrólisis, el uso de LiOH parece producir buenos resultados en muestras alimenticias. Una vez obtenido el triptofano libre se determina espectrofotométricamente con el reactivo de Erlich (Sotelo and Lucas, 1980; Aragón y Lucas, 1991).

Material y reactivos: .

- Hidróxido de Litio 4N.
- Solución lavadora de agua : etanol (3:1).
- Ácido fosfórico concentrado R.A.
- Solución estándar de triptofano (50 µg/ml).
- Ácido clorhídrico concentrado R.A.
- Solución de p-dimetil-amino-benzaldehído al 0.5% en HCl 12N (DMAB).
- Nitrito de sodio al 0.2% (w/w).
- Parrilla de calentamiento y agitación Model PC-320 (Serie 868830).
- Agitador magnético y celdas de vidrio.
- Digestor Tecator a/b 20/40 (Serie 254).
- Espectrofotómetro Squoia-Turner Model 340 (Serie 005948 TF) y
- Balanza analítica.
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYREX No. 9826.
- Potenciómetro Corning Model 10 (Serie D 44676).

Procedimiento:

En un tubo de cultivo de pared gruesa y tapón de rosca con cubierta de teflón (asegurándose que el teflón este en buenas condiciones y que selle bien el tubo), se colocó la cantidad de muestra de acuerdo al contenido de proteína:

$$\text{g de muestra} = (0.1 \times 100) / \% \text{Proteína}$$

A continuación se adicionó con mucho cuidado la cantidad de álcali, teniendo la precaución de no salpicar la muestra en la pared del tubo.

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

Una vez que se tuvo la cantidad de muestra y álcali adecuada, se insufló nitrógeno y se cerró el tubo perfectamente. Se colocó en el digestor que se encontraba a 145°C. El tiempo de permanencia en el digestor lo determinó el %proteína de la muestra (tabla 9) (Sotelo and Lucas, 1980).

TABLA 9. TIEMPO DE HIDRÓLISIS.

Proteína (%)	Tiempo (horas)
9 a < 35	8
35 a ≤ 64	6
> a 65	4

Transcurrido el tiempo de hidrólisis, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se transvasó el contenido del tubo a un vaso de precipitados de 25 ml, lavando el tubo con la solución (aproximadamente 20 ml). Se neutralizó el hidrolizado con ácido fosfórico concentrado (pH = 6.9 a 7.1) y agitación constante y se aforó a 25 ml. Se filtró en caliente sobre papel de filtración rápida en un büchner con ayuda de vacío (cuando no se realiza la determinación el mismo día, se guarda en congelación y se checa el pH antes de la determinación).

Se tomaron 3 alícuotas de 2 ml c/u del hidrolizado (uno de los tubos nos sirvió como blanco); se adicionó a uno de los tubos 7.5 ml de HCl 12N, mientras que a los otros dos tubos se les adicionó 7.5 ml de la solución DMAB, se agitaron y se dejaron en reposo 15 minutos en la oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo se les adicionó 0.5 ml de nitrito de sodio, agitando nuevamente se dejó en la oscuridad por otros 15 minutos, para que se desarrollara la coloración; por último, se leyó en el colorímetro a 590 nm (filtro verde), usando el tubo del blanco para ajustar a cero el colorímetro.

Se corrió al mismo tiempo, una curva estándar de triptofano de 0 a 100 μg tomando alícuotas de 0.0, 0.4, 0.8, 1.0, 1.6 y 2.0 ml de la solución estándar de triptofano y llevando a 2.0 ml con agua destilada (Aragón y lucas, 1991).

Cálculos:

El valor interpolado en la curva estándar fue en microgramos (μg), tomamos en cuenta la alícuota, el aforo y el peso de la muestra, para expresar el resultado en gramos de triptofano por 100 g de proteína. Para realizar este cálculo fue necesario tener el dato de %proteína de la muestra (Aragón y lucas, 1991).

PREDICCIÓN DE LA CALIDAD PROTEÍICA POR MÉTODOS QUÍMICOS

Score Químico (S.Q.) o Calificación Química:

Su fundamento se basa en señalar la cantidad del aminoácido indispensable que está en mayor deficiencia en la proteína de estudio, al compararla con el nivel presente en una proteína de referencia. En nuestro caso se empleó al huevo

como proteína de referencia (Muller y Tobin, 1992). Se calcula empleando la siguiente ecuación:

$$\text{S.Q.} = \text{el menor valor de la relación } [(AA_x \text{ TAAE}_e / AA_e \text{ TAAE}_x) * 100]$$

Donde:

AA_x = Aminoácido esencial de la proteína en estudio, en mg/gN.

AA_e = Aminoácido esencial de la proteína de referencia, en mg/gN.

$TAAE_e$ = Total de aminoácidos esenciales de la proteína de referencia, en mg/gN

$TAAE_x$ = Total de aminoácidos esenciales de la proteína en estudio, en mg/gN.

Tiene que haber homogeneidad en unidades usadas, tanto de la proteína en estudio como la de referencia. Se calculó el contenido total de aminoácidos esenciales, no olvidando adicionar las cantidades de cisteína y tirosina, ya que es conveniente reportar como total de aminoácidos azufrados y aromáticos, respectivamente.

Índice de aminoácidos indispensables (I.A.A.E.)

Dentro de los estándares recomendables para comparar la proteína de la muestra están la leche humana y la proteína del huevo entero, esta comparación deriva en el cálculo del índice de aminoácidos indispensables (IAAE), el cual esta basado en la proporción mínima del contenido relativo de aminoácido indispensables de la muestra con respecto al que hay en una proteína estándar que puede ir de 1.0% hasta un 100%. Se define como la media geométrica de las proporciones de los aminoácidos de la muestra y los aminoácidos del estándar. Calculándose de la siguiente manera:

$$\text{IAAE} = \sqrt[n]{ \frac{\text{aai muestra}}{\text{aai std}} (1) \times \dots \times \frac{\text{aai muestra}}{\text{aai std}} (n) }$$

Donde:

aai muestra = Aminoácidos indispensable en la proteína del alimento, en meg/gN.

aai std = Aminoácido indispensable en la proteína estándar, en mg/gN.

n = Número de aminoácidos (debe considerarse como un sólo valor la suma de aminoácidos azufrados y de aromáticos).

PRUEBAS BIOLÓGICAS

Para realizar las pruebas biológicas se consideraron los siguientes criterios:

Animales:

Se emplearon ratas recién destetadas de la raza Wistar, de aproximadamente 21-23 días de edad, machos y con un peso inicial de 40-50 gramos. Seis ratas para cada dieta.

Condiciones experimentales:

- Humedad relativa: 50%
- Temperatura ambiente: 20-25°C
- Iluminación: 12 horas luz y 12 horas obscuridad.
- Alimentación: dieta respectiva y agua *ad libitum*.
- Tiempo experimental: 21 días (excepto la dieta libre de nitrógeno DLN, cuya duración es de 11 días).

Distribución de animales:

Al inicio del experimento las ratas se pesaron en forma individual, cuyo dato corresponde al peso inicial (P_i) del experimento. Para una adecuada distribución

de los animales por lote, se procedió a repartirlos de acuerdo a la distribución japonesa (Delgado y Revuelta, 1993), siguiendo los siguientes pasos:

- Se pesaron los animales.
- Se ordenó por peso en orden creciente o decreciente.
- Se diseñó una tabla en la cual se contempló el número de lotes utilizados (columna por lote).
- Se distribuyó el orden de pesos de izquierda a derecha, uno por cada lote. Al terminar la primera fila, se continuó distribuyendo de derecha a izquierda en la segunda fila, y así sucesivamente (zig-zag) hasta la sexta fila.

El rango de peso entre los animales no excedió de 10 gramos. Se manejaron 6 ratas por dieta (10 dietas) y éstos se colocaron en jaulas individuales. Debido a que estos animales al comer tienden a desperdiciar alimento, se colocó debajo de la jaula, una charola de papel manila, para poder recuperar este material.

Material y reactivos:

- Rack con el número de jaulas de metal individuales necesarios, con su respectivo comedero y bebedero.
- Balanza granataria (± 0.1 g).
- Balanza granataria para animales de laboratorio OHAW, mod. 700.
- Tamiz metálico y papel manila (pliegos).
- Mezcladora HOBART, mod. N-50.
- Caseína (INC pharmaceuticals).
- Dextrina y aceite de maíz comerciales.
- Mezcla de sales y vitaminas (INC pharmaceuticals).
- Celulosa en polvo (INC pharmaceuticals).

RELACIÓN DE EFICIENCIA DE LA PROTEÍNA (PER)

En 1919 Osborne, Mendel y Ferry introdujeron el concepto de "PER" (Protein Efficiency Ratio), el cual, en varias formas modificadas, es el procedimiento más ampliamente usado de las pruebas biológicas para la evaluación de una fuente de proteína. Para esta prueba se recomienda ratas macho recién destetadas (20-23 días), cuyo período de estudio sea de 3 a 4 semanas y su dieta con un contenido de proteína del 10%, la cual provea de los demás nutrientes en cantidad suficiente; tanto el alimento como el agua deben darse *ad libitum* (Chapman, 1959; Hurt, 1975; Yang and Michelsen, 1974).

Fundamento:

Generalmente se acepta que el incremento en peso de ratas destetadas alimentadas con una dieta proteínica, bajo condiciones estandarizadas, provee una medida confiable del valor nutritivo. Factores como la edad, sexo, período de ensayo, nivel de proteína, entre otros, puede afectar la determinación del PER; las condiciones de experimentación deben estar bien definidas, así como el uso de un grupo control de caseína (De Maeyer, 1975; Hurt, 1975; Yang and Michelsen, 1974).

Esta prueba relaciona la ganancia de peso del animal en prueba con la proteína consumida, asumiendo que el incremento en peso es exclusivo del nitrógeno corporal (Biological assay methods for protein evaluation, 1963; Campbell, 1961).

Desarrollo de la prueba:

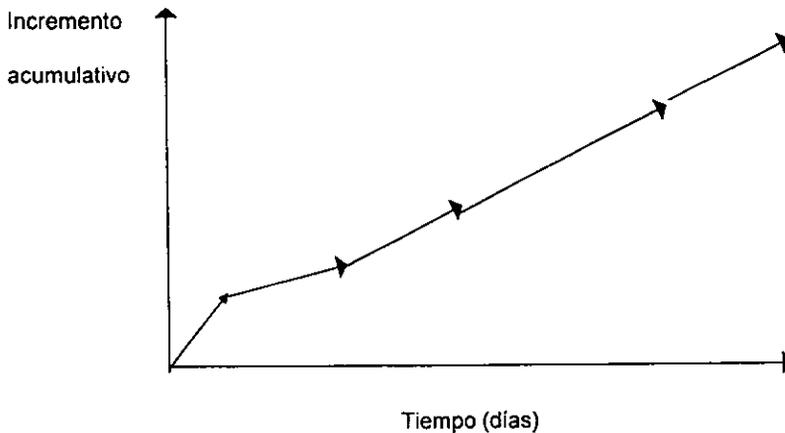
Una vez que se distribuyeron los animales en su respectiva jaula, se le colocó a cada uno su respectivo alimento (pesado) y agua. Se pesaron tanto los animales como el alimento de 2-3 veces por semana, teniendo la precaución de recuperar el alimento desperdiciado, haciendo uso de un tamiz para separar el alimento

tirado de las heces del animal. El agua del bebedero se cambió periódicamente para evitar la aparición de hongos. La forma cronológica del desarrollo del bioensayo se muestra en el Apéndice II: Ensayo Biológico.

El estudio se mantuvo por espacio de 3 semanas, al final de las cuales se pesaron tanto el alimento como el animal, este último dato correspondió al peso final (Pf). Se realizaron las pesadas en el mismo horario para que a lo largo del estudio se tuviera la menor variación. Para llevar a cabo el control de los datos, se empleó una hoja de anotación (Apéndice III: Registro de datos para la prueba biológica) y poder, al final del experimento, sacar la información de una manera rápida y fácil.

Cálculos:

Se realizó la curva de crecimiento de cada lote, para lo cual se procedió a trazar la gráfica de Tiempo vs. Incremento de peso acumulativo. Esta gráfica nos permitió visualizar la tendencia de la respuesta de los animales de estudio.



Se obtuvo el valor del PER, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{PER} = \text{incremento de peso (g)} / \text{proteína ingerida (g)}$$

$$\begin{aligned} \text{PER} &= (\text{Pf} - \text{Pi}) / (\Sigma \text{AI} \times \text{F}) \\ &= \Delta \text{P} / (\Sigma \text{AI} \times \text{F}) \end{aligned}$$

Donde: ΔP = Incremento corporal (Pf - Pi).

ΣAI = Alimento acumulativo ingerido total.

F = Factor que corresponde al contenido de proteína de la dieta, expresado en fracción decimal (%Proteína / 100 = 0.1).

Con cada uno de los valores individuales, se procedió a calcular el PER promedio del lote en estudio, para lo cual sólo se manejaron los datos que fueron promediabiles (CV \leq 15).

$$\text{PER}_{\text{PROMEDIO}} = \sum_{i=1}^n \text{PER} / n$$

$$\text{CV} = (\sigma / \text{PER}_{\text{PROMEDIO}}) \times 100$$

Para que nuestros datos fueran comparativos fue necesario expresarlos en valores de PER ajustado, es decir, tomar como referencia el valor de 2.5 para la dieta de caseína (lote control).

$$\text{PER}_{\text{AJUSTADO}} = \text{PER}_{\text{PRUEBA}} \times (\text{PER}_{\text{CASEÍNA REF.}} / \text{PER}_{\text{CASEÍNA (EXP.)}})$$

$$\text{PER}_{\text{CASEÍNA (Ref.)}} = 2.5$$

RELACIÓN NETA DE LA PROTEÍNA (NPR)

Bender y Doell propusieron el uso del llamado "NPR" (Net Protein Ratio), como una prueba biológica nutritiva, en donde se hace uso de un grupo control negativo. Básicamente el método involucra alimentar un lote de animales con una dieta conteniendo una proteína de referencia (caseína); además se introduce un grupo control de una dieta libre de nitrógeno (DLN); y se corre al mismo tiempo las

dietas de prueba, que deben ser isoproteínicas e isocalóricas con respecto a la dieta de referencia (Bender and Doell, 1957; Sarwar and Mc Laughlan, 1981).

Con este tipo de cálculo se menciona que se sobreponen las variaciones en alimentos ingeridos encontrados en el PER, además de poder trabajar con dietas que produzcan un pobre crecimiento. Se ha observado que el valor de NPR correlaciona estrechamente con la determinación de NPU (Net Protein Utilization), incluso Bender y Doell han encontrado un factor experimental de 16 para correlacionar ambas determinaciones (De Maeyer, 1975; Mc Laughlan and Kerth, 1975).

Fundamento:

Con esta determinación, en donde hay un control con pérdida de peso, la cual se suma al incremento o decremento de la dieta de prueba, se asume que la proteína requerida para prevenir la pérdida de peso de las ratas alimentadas con la dieta libre de nitrógeno, es equivalente a las necesidades proteínicas para su mantenimiento. Además cabe mencionar que dicho estudio requiere de un menor tiempo (con lo cual se obtiene un ahorro económico).

Procedimiento:

Se realizó en forma semejante al PER, pero adicionalmente se tuvo que preparar una dieta libre de nitrógeno, cuya formulación se desarrolla basados en el A.O.A.C. (Herlich, 1990). Se llevó a cabo un periodo de prueba de adaptación inicial de los animales que consumieron la dieta libre de nitrógeno, que consistió en tenerlos en el bioterio, ingiriendo caseína durante los primeros 10 días, bajos las condiciones ambientales ya mencionados, al término de los cuales iniciaron la ingestión de la DLN por once días más. Los demás lotes se alimentaron con su respectiva dieta para su etapa de adaptación (Apéndice II: Ensayo Biológico).

Cálculos:

Se requirió de un control adecuado del peso del animal, así como del alimento ingerido, ya que al final del estudio se usó la siguiente fórmula:

$$\text{NPR} = (\Delta\text{P del grupo prueba} - \Delta\text{P' del grupo no proteínico}) / \text{P.I. del grupo prueba}$$

Donde:

ΔP = Incremento en peso, en gramos.

$\Delta\text{P'}$ = Incremento en peso del grupo con la DLN (valor negativo), en gramos.

P.I. = Proteína ingerida, en gramos.

Se recomendó reportar el valor de NPR como NPR ajustado o corregido, para lo cual una dieta de caseína con un nivel de 10% de proteína, dio como valor promedio 4.16 de NPR, así tuvimos que:

$$\text{NPR}_{\text{CORREGIDO}} = \text{NPR}_{(\text{PRUEBA})} \times (\text{NPR}_{\text{CASEÍNA (REF.)}} / \text{NPR}_{\text{CASEÍNA (EXP.)}})$$

$$\text{NPR}_{\text{CASEÍNA (REF.)}} = 4.1$$

UTILIZACIÓN NETA DE LA PROTEÍNA (NPU) ORIGINAL

Miller y Bender diseñaron un método para evaluar la calidad de una proteína mediante la determinación del nitrógeno retenido en el cuerpo del animal experimental, analizando el cuerpo entero del animal; el nitrógeno contenido en el carcass al término el período de ensayo (10 días), durante los cuales los animales experimentales recibieron la dieta de prueba, reflejaron la ganancia de proteína corporal por el crecimiento y mantenimiento después de la sustracción del contenido de nitrógeno de la canal del animal que han recibido una dieta libre de nitrógeno. La eficiencia de nitrógeno de la dieta de prueba es expresada como una relación de la ganancia de proteína de la proteína ingerida durante el período

experimental. El NPU es un parámetro claramente definido para medir la calidad de una proteína, el cual puede ser determinado de varias formas. El procedimiento descrito por Miller y Bender ha sido utilizado en varios trabajos y en muchos países, pocas modificaciones han sido publicadas (Campbell, 1961).

El NPU no es afectado teóricamente por las pérdidas endógenas. Los valores de NPU dependen sobre todo de la concentración de proteína en la dieta; sin embargo, el NPU es constante cuando se determinan los niveles de proteína.

Procedimiento:

Se realizó en forma semejante al NPR, sólo que al término de los 21 días (11 días de adaptación y 10 de prueba (ver Apéndice II: Ensayo Biológico), se sacrificaron los animales, empleando una cámara de bióxido de carbono. Una vez muerto el animal se separó la piel, eliminando las vísceras del mismo. El carcass obtenido de esta manera se pesó en fresco y se secó en una estufa de circulación forzada a una temperatura de 60-65°C hasta peso constante, posteriormente se molió y guardó en recipientes adecuados bajo refrigeración.

Se determinó nitrógeno por duplicado por Microkjeldahl a todo el material biológico (carcass), utilizando un aparato automatizado con una variabilidad en las determinaciones menor al 5% (C.V. \leq 5%).

Cálculos :

Para realizar el cálculo del NPU se tuvo mucho control sobre los factores que tienen mayor relevancia sobre el NPU, como son los pesos corporales de los grupos experimentales (de prueba y de control negativo) y la cantidad de proteína ingerida por los grupos de prueba. Para realizar los cálculos se emplearon la siguiente fórmula:

$$\text{NPU original} = (\text{N retenido}_{\text{GPO. PRUEBA}} / \text{N ingerido}_{\text{GPO. PRUEBA}}) \times 100$$

El NPU se calculó a partir de la ganancia de nitrógeno corporal de la dieta de prueba con respecto al nitrógeno corporal del grupo de prueba alimentado con la dieta libre de nitrógeno (DLN), expresado en gramos, es decir:

$$\text{NPU original} = [(\text{Nc}_p - \text{Nc}_{\text{DLN}} + \text{N ingerido}_{\text{DLN}}) / \text{N ingerido}_p] \times 100$$

Donde :

Nc_p = Nitrógeno corporal del grupo de prueba, en gramos.

Nc_{DLN} = Nitrógeno corporal del grupo con DLN, en gramos.

$\text{N ingerido}_{\text{DLN}}$ = Nitrógeno ingerido por el grupo con DLN, en gramos.

N ingerido_p = Nitrógeno ingerido por el grupo de prueba, en gramos.

El nitrógeno corporal y el nitrógeno ingerido, tanto del grupo de prueba como del grupo con DLN, se determinaron de la siguiente manera:

$$\text{Nc} = \text{N corporal} = (\text{Peso final} \times \% \text{N en carcass}) / 100$$

$$\begin{aligned} \text{N ingerido} &= \text{Nitrógeno ingerido} \\ &= (\text{Alimento ingerido} \times \text{Proteína de dieta}) / (\text{Factor} \times 100) \end{aligned}$$

Dado que el nitrógeno ingerido por el grupo con DLN es igual a cero, la fórmula queda de la siguiente forma:

$$\text{NPU original} = [(\text{Nc}_p - \text{Nc}_{\text{DLN}}) / \text{N ingerido}_p] \times 100$$

Cabe mencionar que para la determinación del NPU original, el nitrógeno corporal del grupo de prueba (Nc_p) correspondió al contenido de nitrógeno en el carcass.

UTILIZACION NETA DE LA PROTEINA (NPU) MODIFICADO

Procedimiento:

Se realizó en forma semejante al NPU original, sólo que una vez muerto el animal se realizó una incisión a la mitad del cuello bajando hacia el tórax y demás cavidades del cuerpo, extrayendo inmediatamente el hígado, riñones, bazo, corazón e intestino (primera parte del intestino delgado, específicamente el yeyuno, eliminando los primeros 10 cm) y separando ambas patas superiores. Estos órganos y tejidos fueron pesados inmediatamente (en fresco) (tabla 10).

TABLA 10. TEJIDOS EMPLEADOS PARA LA PRUEBA.

ÓRGANOS O TEJIDOS ANALIZADOS	OBSERVACIONES
Hígado	Órgano completo
Riñones	Órgano completo
Corazón	Órgano completo
Patas delanteras	Extremidades superiores, sin garras.
Intestino delgado	Primera parte del intestino delgado, específicamente del yeyuno (eliminando los primeros 10 cm)
Bazo	Órgano completo

Los tejidos se guardaron en viales bajo congelación. Se determinó nitrógeno por duplicado por Microkjeldahl a todo el material biológico, utilizando un aparato automatizado con una variabilidad en las determinaciones menor al 5% (C.V. \leq 5%). Cabe mencionar que los remanentes de los órganos y tejidos frescos se liofilizaron para su conservación y posible uso futuro.

Cálculos :

Para realizar el cálculo del NPU se tuvo mucho control los pesos corporales de los grupos experimentales (de prueba y de control negativo) y la cantidad de proteína ingerida por los grupos de prueba. Para realizar los cálculos se emplearon la siguiente fórmula:

$$\text{NPU modificado} = (\text{N retenido}_{\text{GPO. PRUEBA}} / \text{N ingerido}_{\text{GPO. PRUEBA}}) \times 100$$

El NPU se calculó a partir de la ganancia de nitrógeno corporal de la dieta de prueba con respecto al nitrógeno corporal del grupo de prueba alimentado con la dieta libre de nitrógeno (DLN), expresado en gramos; sin embargo, para el cálculo del NPU modificado se realizó un análisis estadístico completo, que más adelante se detalla, para determinar cual de todos los órganos o tejidos estudiados se correlacionaban de manera significativa con el carcass en cuanto a concentración de nitrógeno mediante una ecuación dada; de esta manera, una vez obtenido el contenido de nitrógeno corporal del grupo prueba pero calculado a partir de la ecuación que involucraría a uno o más órganos o tejidos (al cual llamaremos nitrógeno corporal calculado del grupo prueba, N_{cc_p}), se sustituyó en la fórmula para obtener el NPU modificado correspondiente.

$$\text{NPU modificado} = [(N_{cc_p} - N_{c_{DLN}} + N_{ingerido_{DLN}}) / N_{ingerido_p}] \times 100$$

Donde :

N_{cc_p} = Nitrógeno corporal del grupo de prueba calculado, en gramos.

$N_{c_{DLN}}$ = Nitrógeno corporal del grupo con DLN, en gramos.

$N_{ingerido_{DLN}}$ = Nitrógeno ingerido por el grupo con DLN, en gramos.

$N_{ingerido_p}$ = Nitrógeno ingerido por el grupo de prueba, en gramos.

El nitrógeno corporal calculado y el nitrógeno ingerido, tanto del grupo de prueba como del grupo con DLN, se determinó de la forma siguiente:

$$N_{cc} = N \text{ corporal calculado} = (\text{Peso final} \times \%N \text{ en carcass calculado}) / 100$$

N ingerido = Nitrógeno ingerido

$$= (\text{Alimento ingerido} \times \text{Proteína de dieta}) / (\text{Factor} \times 100)$$

Dado que el nitrógeno ingerido por el grupo con DLN es igual a cero, la fórmula queda de la siguiente manera:

$$NPU \text{ modificado} = [(N_{cc} \text{ }_p - N_{c \text{ DLN}}) / N \text{ ingerido }_p] \times 100$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos obtenidos (concentración de nitrógeno) se procedió a derivar el mejor modelo predictor (*) de acuerdo al siguiente plan:

$$\begin{aligned} \hat{y} \text{ (carcass)} &= b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_4 x_4 + b_5 x_5 + b_6 x_6 + \dots \\ & b_0 + b_7 x_1^2 + b_8 x_1 x_2 + b_9 x_1 x_3 + b_{10} x_1 x_4 + b_{11} x_1 x_5 + b_{12} x_1 x_6 + \dots \\ & b_0 + b_{13} x_2^2 + b_{14} x_2 x_3 + b_{15} x_2 x_4 + b_{16} x_2 x_5 + b_{17} x_2 x_6 + \dots \\ & b_0 + b_{18} x_3^2 + b_{19} x_3 x_4 + b_{20} x_3 x_5 + b_{21} x_3 x_6 + \dots \\ & b_0 + b_{22} x_4^2 + b_{23} x_4 x_5 + b_{24} x_4 x_6 + \dots \\ & b_0 + b_{25} x_5^2 + b_{26} x_5 x_6 + \dots \\ & b_0 + b_{27} x_6^2 \end{aligned} \tag{1}$$

Donde: x_1 = hígado, x_2 = manita, x_3 = riñón, x_4 = corazón, x_5 = intestino
 x_6 = alimento (señalado de 1 a 10), \hat{y} = carcass.

Debe hacerse notar lo extenso del modelo buscado. El modelo (1) comprende:

- Un término constante (1).
- Seis términos lineales ($b_1 \dots b_6$).

- Todas las interacciones posibles entre los seis factores principales. Esto es, los productos $x_1 x_1$, $x_1 x_2 \dots x_1 x_6$ y así para todos los factores.

Con lo anterior se buscó medir la importancia individual de cada factor ($b_1 \dots b_6$); la importancia de las interacciones de cada factor con los demás (b_{12} , $b_{13} \dots$ etc.) y esa importancia consigo mismo (b_{11} , $b_{22} \dots$ etc.).

En modelos tan avanzados es importante tener cuidado de diferenciar los efectos reales y físicos de aquellos resultados meramente matemáticos, pero sin realidad física, que es la que nos interesa. Por eso recurrimos a un programa computacional especial que describimos a continuación.

Programa Computacional:

En este programa se comenzó señalando dos límites de significancia y un límite de error por redondeo. Los límites de significancia se dieron como la estadística F de Fisher, que se le exigió a cada variable para ser admitida en el modelo de regresión (F de entrar). Así mismo, se fijó un segundo límite para que cada variable ya en la regresión siga en ésta al entrar una nueva variable.

Conscientes de que mucha de la confusión que reina en la literatura del caso es debida a que en modelos tan complejos como el modelo (1), los pequeños errores de redondeo que tienen aún computadoras avanzadas, pueden transmitirse y acumularse, dando lugar a resultados confusos. Decidimos establecer el siguiente límite: si un número es inferior al límite que fijaremos no podrá ser usado en la división al invertir matrices. De esta forma evitamos divisiones que produzcan cocientes artificialmente grandes y que, al final de la regresión, dan lugar a términos con coeficientes falsos (por lo grande). Es el FENÓMENO DE INFLACIÓN DE COEFICIENTES (Draper and Smith, 1966; Chatterjee and Price, 1977; Fabila, 1998).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

La estadística de Fisher (F) es la relación de la variabilidad del modelo respecto del error experimental. Por consiguiente, una $F=1$ significa que el modelo tiene una variable igual al error experimental y no es significativa. En el modelo se eligió una estadística F de 1.1 exigiendo que la variabilidad este ligeramente arriba del error experimental. Esta exigencia o límite se impuso tanto a las variables para entrar al modelo como para salir del mismo. Estos límites expresaron cuantas veces es mayor una cantidad respecto del error experimental. Esto es, si damos valores de 1.0 estaremos considerando significativas cantidades iguales al error experimental. Desde luego, límites inferiores a 1.0 admitirán como significativas cantidades menores que el error experimental. Como en nuestro caso buscamos cantidades físicamente reales, establecemos un límite de significancia superior al error experimental. Para que una variable sea admitida en el modelo deben de tener cuando menos una F de 1.1; a su vez, variables ya existentes en el modelo serán sacados del mismo si su F disminuye de 1.1. La tolerancia en divisores, se fijó en 0.000001. Esta cifra esta de acuerdo con las cifras significativas de la mayoría de las microcomputadoras actuales.

Operación del programa:

El programa comenzó suponiendo que ninguno de los factores son significativos. Esto es, que el modelo es sencillamente:

$$\hat{y} = \bar{y} \quad (2)$$

Donde: \bar{y} = Promedio de las respuestas o resultados experimentales.

El modelo (2) que no hay en realidad ninguna influencia de los factores y que los varios valores experimentales son debidos al error experimental. De hecho el programa calcula este error experimental y lo informa al usuario.

A continuación el programa buscó cuál variable o transformación era significativa para entrar y, al mismo tiempo, explicó lo más posible. Con esta variable se calculó el siguiente modelo:

$$\hat{y} = b_0 + b x \quad (3)$$

Donde: b_0 = Término constante

b = Coeficiente de regresión de la variable encontrada significativa.

Entonces el programa volvió a buscar otra variable o transformación significativa y, como antes, al encontrarla se calculó el modelo:

$$\hat{y} = b_0 + b x + b^1 x^1 \quad (4)$$

Donde: b^1 = Coeficiente de regresión de la variable (x^1) ahora encontrada significativa

Entonces el programa verificó si al introducir (x^1) en (4), (x) continuaba siendo **significativa**. Si su significancia resultara INFERIOR a la F-SALIR, se quita esta variable, proponiendo el modelo:

$$\hat{y} = b_0 + b^1 x^1 \quad (5)$$

En caso contrario, se propone el modelo (4) y el programa continúa detallado como antes. De esta forma nos aseguramos de obtener un MODELO PARSIMONIOSO, lo que significa que el modelo explica lo más con los menos coeficientes de regresión. Esto es, un modelo lo más **realista** posible (Draper and Smith, 1966; Chatterjee and Price, 1977; Fabila, 1998).

ERROR EXPERIMENTAL Y ERROR DE EXPERIMENTACIÓN

Con frecuencia confundimos error experimental con error de experimentación. Este último es el que puede resultar de un mal ajuste de nuestros equipos, de nuestra inexperiencia, de pequeños accidentes, etc. Su característica esencial es

que es minimizable y en buena parte evitable. No así el error experimental, el cual se origina de nuestra impotencia de medir exactamente variables físicas.

La teoría Estadística Fundamental nos enseña que:

- Esas medidas tienen un valor promedio, fijo y típico de la medición y su ambiente. A esta permanencia del error se le llama Homoscedasticidad.
- Esas medidas tienen una varianza, también característica.
- Siguen los errores una distribución normal; esto es, el 95% de las mediciones caen dentro de ± 2 desviaciones estándar del promedio, y el 99% de ellas caen dentro de ± 5 desviaciones estándar. Casi el 65% de esas medidas están en el rango de \pm una desviación estándar.

El error experimental es sólo aproximable por replicación del experimento, ésto es, replicando una o más veces un mismo experimento (Fabila, 1998).

ANALISIS DE VARIANZA

Una vez calculado el NPU original se realizó el análisis de Varianza (A.N.O.V.A.) para determinar la existencia de diferencia significativa entre las medias de los valores de NPU correspondientes a las 9 dietas; se procedió de la misma forma con el NPU modificado.

El análisis de varianza es un índice cuantitativo de la significancia; es decir, de la credibilidad de nuestros cálculos, es una técnica estadística que, con base al principio de *t* de Student, nos permitió estudiar la existencia de diferencia significativa entre la media de las calificaciones asignadas a más de dos muestras. Esta técnica de análisis puede desarrollarse para explicar en diversos niveles, el comportamiento de los datos propios de un experimento. En nuestro caso se empleó el nivel de una vía, ya que sólo se explicó la diferencia entre una

variable de estudio (NPU original, así como NPU modificado) (Pedrero y Pangborn, 1989).

Una vez determinada la existencia de diferencia entre las muestras, fue necesario evaluar entre sí cuales eran diferentes. Para ésto se aplicó la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher (DMS o LSD). Se calculó un factor equivalente a la distancia mínima permisible que una muestra puede alejarse de otra. La distancia entre una muestra y otra se calculó restando el valor de la media de dos muestras. Si esta diferencia fuera menor que el valor calculado de DMS, se concluye que no hay diferencia significativa entre esas medias; pero si el valor es mayor que el de DMS, entonces si hay diferencia significativa entre ambas muestras, con un nivel de significancia equivalente al utilizado en el cálculo de DMS (Pedrero, 1989).

CORRELACIÓN Y REGRESIÓN

También se realizaron diferentes correlaciones: entre índices biológicos teóricos y experimentales, entre índices químicos teóricos y experimentales, etc. El estadístico coeficiente de correlación (Pearson) nos permitió analizar el nivel de relación existente entre dos variables. Cuando se da una buena relación entre las variables podemos esperar que los datos se comporten en forma de una línea recta. El coeficiente de correlación (r) se desplaza dentro del siguiente rango:

Desde + 1 = indica correlación perfecta

0 = indica que no hay relación alguna

Hasta - 1 = indica perfecta correlación negativa

Al graficar determinados datos que presenten una $r = 1$ obtendremos una línea recta con pendiente positiva; o sea, a medida que aumente la variable independiente (abscisas), la variable dependiente también aumentará (ordenadas). Una $r = -1$ indica que la pendiente es negativa; o sea que a medida

que una variable aumenta, la otra disminuye (Pedrero y Pangborn, 1989). Para el cálculo del coeficiente de correlación se utilizó la siguiente fórmula simplificada:

$$r = [N (\Sigma XY) - (\Sigma X) (\Sigma Y)] / [\sqrt{ \{ (N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2) (N \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2) \} }]$$

Donde: X, Y = valores de los datos que han de correlacionarse.

N = número de datos de X o Y, pero no de X + Y; este dato también indica el número de jueces que participaron en el análisis.

La correlación lineal nos permite entender si el grado de asociación que existe entre dos series de datos es o no de tipo lineal. Por otra parte, nos permite saber qué tipo de línea describe mejor el comportamiento de una serie de datos. De ahí que la regresión lineal se base en la ecuación de la línea recta:

$$Y = a X + b$$

Donde: Y, X = valores dependientes e independientes de un experimento.

a = pendiente que describe la recta.

b = punto de intersección de la recta en el eje "Y".

Así, nuestras incógnitas son la pendiente y el punto de intersección. Cuando se quiere encontrar un valor de Y para una X dada, se sustituye en la ecuación calculada (Pedrero y Pangborn, 1989). Aquí describimos su fórmula para calcular la curva que mejor describa los datos:

$$a = \{ \Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y / N \} / \{ \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2 / N \}$$

$$b = \{ \Sigma Y - a \Sigma X \} / N$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LAS FUENTES DE PROTEÍNA

ANÁLISIS PROXIMAL.

En las tablas 11 y 12 se presentan los datos obtenidos a partir del análisis proximal de cada una de las fuentes de proteína que se seleccionaron, tanto en base húmeda como en base seca, respectivamente.

TABLA No. 11 ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS FUENTES DE PROTEÍNA¹.

ANÁLISIS PROXIMAL BASE HÚMEDA (g / 100 g de muestra)						
FUENTE	HUMEDAD	PROTEÍNA CRUDA	GRASA CRUDA	CENIZAS	FIBRA CRUDA	CHO'S ²
HUEVO EN POLVO	2.56	47.87 ^a	36.10	3.93	---	9.53
LECHE EN POLVO	2.42	24.08 ^b	23.95	5.87	---	43.67
CASEÍNA	2.61	85.46 ^b	0.14	0.51	---	11.28
AISLADO DE SOYA	4.62	71.13 ^c	0.53	9.69	---	14.02
GARBANZO	7.10	19.46 ^a	5.41	2.55	3.40	62.08
TRIGO	11.13	9.74 ^e	1.83	1.82	2.73	72.71
AJONJOLÍ	6.02	28.36 ^d	24.99	7.42	5.17	28.03
LENTEJA	10.34	22.97 ^a	0.93	2.01	4.93	58.81
SORGO	15.42	7.94 ^a	2.61	1.67	2.16	70.18
GELATINA	3.50	88.17 ^f	0.07	1.87	---	6.37

1. Todos los resultados se realizaron por duplicado, con una diferencia entre el duplicado no mayor al 3.0%.

2. CHO'S = Hidratos de carbono asimilables calculados por diferencia.

a) Factor de conversión de nitrógeno total a proteína cruda: 6.25; b) 6.38; c) 5.71;

d) 5.30; e) 5.83; f) 5.55

TABLA NO. 12. ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS FUENTES DE PROTEÍNA¹.

ANÁLISIS PROXIMAL BASE SECA (g / 100 g de muestra)					
FUENTE	PROTEÍNA CRUDA	GRASA CRUDA	CENIZAS	FIBRA CRUDA	CHO'S ²
HUEVO EN POLVO	49.13 ^a	37.05	4.03	---	9.78
LECHE EN POLVO	24.68 ^b	24.54	6.02	---	44.76
CASEÍNA	87.75 ^b	0.14	0.53	---	11.58
SOYA	74.58 ^c	0.56	10.16	---	14.70
GARBANZO	20.94 ^a	5.82	2.74	3.66	66.83
TRIGO	10.96 ^e	2.06	2.05	3.08	81.81
AJONJOLÍ	30.18 ^d	26.59	7.90	5.50	29.82
LENTEJA	25.62 ^a	1.04	2.24	5.50	65.59
SORGO	9.39 ^a	3.09	1.98	2.55	82.97
GELATINA	91.37 ^f	0.07	1.94	---	6.61

3. Todos los resultados se realizaron por duplicado, con una diferencia entre el duplicado no mayor al 3.0%.

4. CHO'S = Hidratos de carbono asimilables calculados por diferencia.

a) Factor de conversión de nitrógeno total a proteína cruda: 6.25; b) 6.38; c) 5.71; d) 5.30; e) 5.83; f) 5.55

En el caso de que alguna fuente presentara una restricción en cuanto a su contenido de proteína, no se descartó la posibilidad de usar un nivel de proteína diferente al 10% para la elaboración de las dietas isoproteicas. Se decidió eliminar al sorgo como fuente de proteína desde el inicio ya que dicha fuente presentó un nivel de proteína muy bajo (7.94%), en la bibliografía se reporta para el sorgo un contenido de proteína promedio de 11 %, aunque pueden presentarse contenidos de proteína dentro del rango comprendido de 7.3-15.6 %, razón por la cual se le había elegido como una de las fuentes de proteína de baja calidad, su composición varía, principalmente dependiendo de la variabilidad de la semilla, es decir, debido a su propia genética y de las condiciones ambientales que se hayan tenido para su cultivo, cosecha y almacenamiento. Se pudo haber elaborado una dieta con un nivel de proteína del 8% pero esto habría representado otra variable

más en nuestro estudio. El nivel de proteína en una dieta de prueba es de importancia crítica (Macrae, 1993).

Por otra parte, el sorgo también presentó otra limitante, su contenido de factores antinutricionales (taninos) y aunque los tratamientos tecnológicos (sobre todo los térmicos), inactivan en gran parte dichos factores, si éstos no se llevan a cabo adecuadamente, los factores antinutricionales aún presentes pueden alterar su disponibilidad biológica, como en el caso del sorgo café que tiene un bajo valor nutritivo aún sin contener taninos. Por estas razones se sustituyó el sorgo por otra fuente de proteína de la misma calidad como lo es el garbanzo, cuyo análisis proximal también se incluye en las tablas 11 y 12. En el caso del trigo, aunque también presentó un nivel de proteína menor al 10% (9.74%), no se eliminó como fuente de proteína ya que su menor contenido de proteína no fue tan crítico como el del sorgo.

Todos los resultados se encuentran dentro de los rangos reportados para las diferentes fuentes de proteína. Las pequeñas variaciones existentes son debidas en parte, como ya se había mencionado anteriormente, a las condiciones ecológicas en que se producen los alimentos; lo anterior debe considerarse principalmente en el caso de las proteínas de origen vegetal, pues su composición varía dependiendo de las condiciones climatológicas, de la composición del suelo donde se desarrollan, de las condiciones de cultivo, del estado de madurez que tengan cuando se cosechan, entre otros. Por ejemplo, la concentración de los principales constituyentes del garbanzo es mayor si la semilla esta completamente madura. Claro que las semillas inmadura son superiores en el aspecto nutritivo si consideramos valores en base seca. En el caso de las proteínas animales se puede tener variaciones debidas a la raza del animal (Kay, 1979). Si comparamos estos valores con los reportados en la bibliografía (F.A.O., 1970) observamos variaciones en determinadas fuentes de proteína, a saber el huevo entero deshidratado, la leche entera en polvo, la caseína, el aislado proteínico de soya y la pasta residual de ajonjolí; debemos considerar como origen de dichas

variaciones los procesos tecnológicos de transformación a los cuales son sometidos estas fuentes de proteína para lograr su obtención, ya que durante su transformación pueden haber variaciones de temperatura, humedad, tiempo de proceso, secado o extracción de la grasa, por ejemplo. El contenido de grasa que se reporta para el ajonjolí (48 - 52%) es mayor al determinado experimentalmente (26.59%), resultando obvio ya que se empleó la pasta residual del ajonjolí, la fuente original se sometió a una extracción de grasa para la obtención del aceite de ajonjolí.

CONTENIDO CALÓRICO.

Para tener una mejor información sobre la composición de las fuentes de proteína y lograr una estandarización del contenido calórico de las dietas a probar para la determinación de índices biológicos, tales como PER, NPR y sobre todo NPU, donde las fuentes de variación a estudiar son las fuentes de proteína y el tejido animal en estudio, es importante conocer su contenido calórico (tabla 13).

TABLA No. 13 Contenido calórico de las fuentes de proteína.

FUENTE	Contenido calórico ^{1,2} (Kcal / 100 g de muestra)
HUEVO EN POLVO	699.30
LECHE EN POLVO	583.95
CASEÍNA	561.19
SOYA	493.10
GARBANZO	460.73
TRIGO	545.57
AJONJOLÍ	427.78
LENTEJA	433.22
GELATINA	487.31

1) EL coeficiente de correlación de la curva estandar de ácido benzoico fue $r=0.993877891$, con un nivel de significancia $p < 0.005$.

1. Se realizó por duplicado, con una diferencia entre el duplicado no mayor al 15.0%.

El contenido calórico de las fuentes de proteína se obtuvo experimentalmente empleando el calorímetro e interpolando en una curva estándar de ácido benzoico. Estos valores variaron en un rango que fue desde 699.3 Kcal/100 g de muestra (huevo) hasta 427.8 Kcal/100 g (ajonjolí). El proceso tecnológico del ajonjolí repercutió enormemente en su contenido calórico ya que el informado (548 Kcal) es mayor en más de cien unidades (428 Kcal) al determinado experimentalmente.

DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS .

En necesario contar con varios métodos de análisis para medir el valor nutritivo de una proteína en una dieta, directa o indirectamente. El contenido de aminoácidos, tanto indispensables como no indispensables, de cada una de las proteínas estudiadas se muestra en tabla 14. Los valores obtenidos caen dentro de los límites informados en la bibliografía (F.A.O., 1970).

El valor biológico de una proteína depende en absoluto de su contenido de aminoácidos indispensables y de su balance, así como, de su relación con los aminoácidos no indispensables. El valor biológico de una proteína es limitado generalmente por (Macrae, 1993):

- Lisina : deficiente en las proteínas de los cereales.
- Metionina : Deficiente en proteínas de leche bovina, carne y leguminosas.
- Treonina : deficiente en trigo y centeno.
- Triptófano : deficiente en maíz, arroz y ausente en gelatina.

TABLA 14. CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS DE LAS FUENTES DE PROTEÍNA.

AMINOÁCIDO	CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS ¹ (mg/g N)								
	HUEVO	LECHE	CASEINA	SOYA	GARBANZO	AJONJOLI	TRIGO	LENTEJA	GELATINA
Metionina	168.04	137.46	178.21	79.92	79.12	116.69	65.57	42.95	86.91
Cisteína	134.08	51.55	19.22	73.18	72.05	105.50	137.86	70.41	69.74
Total de azufrados	302.12	189.01	197.43	153.10	151.17	222.19	203.43	113.36	156.65
Fenilalanina	343.24	319.77	316.22	318.19	333.84	263.01	248.52	304.99	242.26
Tirosina	308.06	337.33	383.89	134.49	212.90	166.02	207.68	231.44	238.74
Total de aromáticos	651.30	647.10	700.11	452.68	546.74	429.03	456.19	536.44	481.00
Triptofano ²	109.38	82.35	112.27	94.07	73.14	59.86	42.18	45.28	11.65
Lisina	625.23	428.15	412.45	333.82	415.09	185.76	167.61	444.66	572.20
Isoleucina	283.46	300.12	344.83	255.54	262.54	215.96	195.37	266.47	263.94
Leucina	537.61	552.59	523.77	533.18	479.51	406.01	392.34	465.86	474.63
Histidina	159.07	161.95	198.74	204.44	186.44	154.31	160.76	144.23	193.24
Valina	417.97	334.79	413.31	286.42	284.63	324.04	323.11	302.77	348.53
Treonina	360.09	192.32	289.86	247.48	246.44	202.45	180.32	240.19	220.09
Total de aminoácidos	3146.23	2888.33	3192.77	2560.73	2645.66	2199.67	2121.32	2559.29	2721.94
Indispensables									
Acido aspártico	868.46	334.84	481.29	768.68	817.27	420.63	252.84	669.95	586.71
Acido glutámico	694.56	657.09	1335.64	1196.88	882.34	918.78	1445.49	842.70	647.19
Glicina-Alanina	346.46	167.33	202.81	311.45	263.97	299.86	286.07	427.55	399.72
Prolina	291.53	561.38	631.68	325.23	331.28	257.44	630.73	238.39	291.78
Serina	382.99	217.69	335.91	313.64	331.48	312.43	267.96	280.35	309.06
Arginina	334.43	134.66	267.14	552.98	679.23	536.29	241.33	524.28	476.99
Total de aminoácidos no indispensables	2918.43	2072.99	3254.47	3468.86	3705.57	2745.43	3124.42	2983.22	1711.45
TOTAL DE AA	6064.66	4961.32	6447.24	6029.59	6351.23	4945.10	5245.74	5542.55	4433.39

1) Las determinaciones se realizaron mediante hidrólisis ácida.

2) La determinación de triptofano se realizó mediante hidrólisis alcalina, obteniendo una diferencia entre el duplicado no mayor al 15.0%.

TABLA 14.1. RESUMEN DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS DE LAS FUENTES DE PROTEÍNA.

AMINOÁCIDO	CONTENIDO DE AMINOACIDOS ¹ (mg / g N)								
	HUEVO	LECHE	CASEINA	SOYA	GARBANZO	AJONJOLI	TRIGO	LENTEJA	GELATINA
Total de azufrados	302.12	189.01	197.43	153.10	151.17	222.19	203.43	113.36	156.65
Total de aromáticos	651.30	647.10	700.11	452.68	546.74	429.03	456.19	536.44	481.00
Total de aminoácidos Indispensables	3146.23	2888.33	3192.77	2560.73	2645.66	2199.67	2121.32	2559.29	2721.94
Total de aminoácidos no Indispensables	2918.43	2072.99	3254.47	3468.86	3705.57	2745.43	3124.42	2983.22	1711.45
TOTAL DE AMINOÁCIDOS	6064.66	4961.32	6447.24	6029.69	6351.23	4945.10	5245.74	5542.55	4433.39

1) Las determinaciones se realizaron mediante hidrólisis ácida.

Algunos de estos datos se corroboran con la tabla de composición de aminoácidos de las fuentes de proteína utilizadas en este estudio donde observamos que efectivamente un cereal fue el que presentó el contenido más bajo de lisina (trigo) con un valor de 167.61 mg / g de N, en comparación con las demás fuentes utilizadas; el ajonjolí también presentó un bajo contenido de lisina (185.76 mg / g de N). Por otro lado, el trigo también presentó un bajo contenido de treonina (180.32 mg/g de N) y si comparamos con los demás contenidos de treonina del resto de las dietas, el trigo fue el que presentó el valor más bajo. La composición del grano de trigo está determinado por factores genéticos y ecológicos, así como por los efectos químicos y físicos que actúan en el grano durante su almacenamiento y procesamiento.

Sin embargo, hay que hacer notar que no por que el perfil de aminoácidos, en especial, de los cereales se encuentren dentro del rango establecidos para estos, quiere decir que sean adecuados nutritivamente hablando, ya que en general los cereales muestran una digestibilidad aparente de proteína en un rango comprendido entre 80-90%. En el caso del sorgo, esta digestibilidad es muy baja por su contenido de taninos condensados. La digestibilidad también se ve afectada por su contenido de fibra (hemicelulosa, celulosa y lignina). Muchos polisacáridos de las paredes celulares asociados a la lignina presentan grupos cargados, los cuales pueden interactuar con las especies ionizadas en la fase acuosa, lo que ocasiona la restricción de la biodisponibilidad de los elementos nutritivos cuando son transportados por las células de la mucosa intestinal. Se incrementa el volumen y la frecuencia de la evacuación de heces, es decir, tiene efectos laxante como resultado de una aceleración de motilidad del colon por un incremento de la masa intraluminal. Dietas con un alto contenido de fibra causan una mala absorción de las proteínas (Macrae, 1993).

Comparando las fuentes de origen animal, tenemos que la leche fue la que presentó la concentración de metionina más baja (137.42 mg / g N), exceptuando a la gelatina. Si consideramos proteínas, tanto de origen animal como vegetal,

encontramos que una leguminosa fue la que presentó el menos contenido de metionina, la lenteja, con un valor de 42.95 mg/g N). Las leguminosas presentan variaciones en el contenido de proteína entre 20% y 40% presentan altos niveles de ácido aspártico y serina y una baja concentración de cisteína y metionina. Su utilización biológica es relativamente baja, presentan una digestibilidad menor al 76 % por la presencia de numerosos compuestos antinutricionales que pueden ser removidos o destruidos durante el proceso de cocción. El perfil de aminoácidos de las leguminosas se caracteriza por su alto contenido de lisina (2.6-8.6 %), su bajo contenido de metionina (0.5-1.4 %) y un contenido total de aminoácidos azufrados de 1.0- 3.3 %, comparando con el patrón de la FAO. La metionina es 50% más bajo del requerimiento del total de aminoácidos azufrados lo que agrava aún más su biodisponibilidad (Macrae, 1993).

En el caso del huevo la composición total varía ligeramente con el tamaño del huevo y, en mayor grado, el huevo de diferentes gallinas. El contenido total de sólidos puede ser alterado significativamente y la proporción de yema y clara. Para la gelatina se encontró una concentración de triptófano de 11.65 mg / g de N, siendo que teóricamente la gelatina no contiene este aminoácido; sin embargo, en alguna bibliografía se informa que pueden encontrarse trazas. En nuestro caso se presentaron trazas debido a que se trabajó con una gelatina comercial y probablemente durante su fabricación se procesaron restos de tejido muscular ocasionando la presencia de trazas de triptófano, obteniendo de esta manera este resultado (Bourgeois y Le Roux, 1982).

ENSAYO PRELIMINAR

Para fines prácticos, en el ensayo preliminar sólo se detallaran aquellos datos que se consideren reelevantes, detallándose otros más sólo en el ensayo final, como por ejemplo el peso de las ratas empleadas, la elaboración de las dietas, etc. La selección de una fuente de proteína no se hace exclusivamente basándose en su contenido de aminoácidos, sino también en las pruebas de carácter experimental basadas tanto en seres humanos como en animales; el ensayo preliminar fue de mucha utilidad para corroborar la adecuada selección de fuentes de proteína y así evitar cualquier sesgo en la información obtenida en el ensayo final. En esta parte se manejaron diez dietas, incluyendo la DLN. El contenido de proteína de las dietas elaboradas en el ensayo preliminar se muestra en la tabla 15, apreciándose claramente en la figura 4, contrastándolo con el contenido de proteína de su fuente original respectiva.

TABLA NO. 15 CONTENIDO DE PROTEÍNA DE DIETAS DEL ENSAYO PRELIMINAR¹.

DIETA	% PROTEÍNA
HUEVO	10.40
LECHE	9.39
CASEÍNA	9.89
SOYA	9.77
GARBANZO	10.82
TRIGO	9.46
AJONJOLÍ	9.41
LENTEJA	10.99
GELATINA	9.55

- 1) Todos los resultados se realizaron por duplicado, con una diferencia entre el duplicado no mayor al 3.0%.

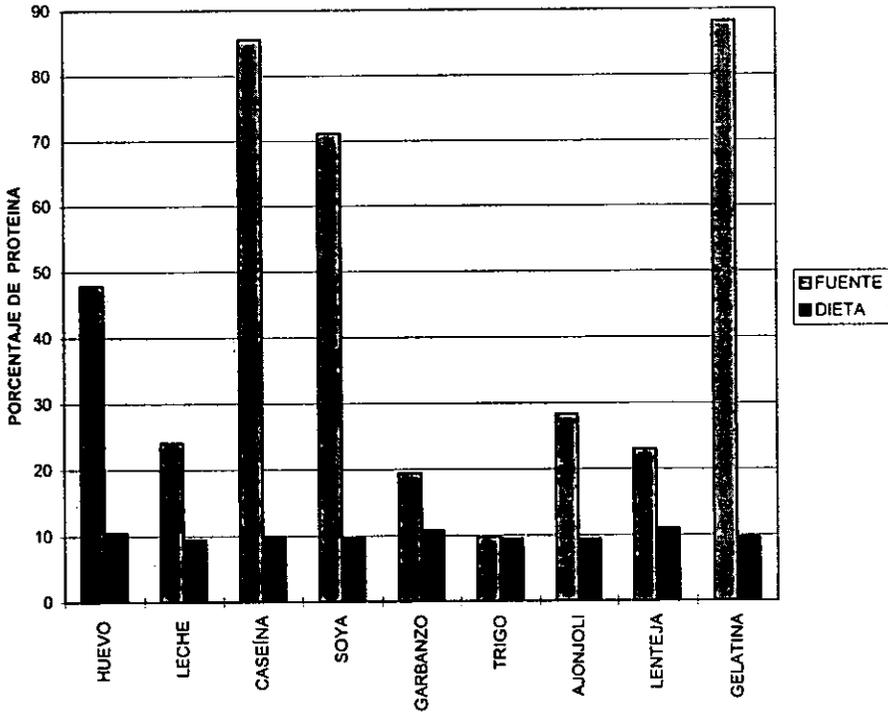


FIGURA NO. 4. CONTENIDO DE PROTEÍNA DE FUENTES Y DIETAS DEL ENSAYO PRELIMINAR

Para corroborar que las fuentes de proteína utilizadas tuvieran una adecuada respuesta biológica, sólo se realizó la prueba biológica de Relación de Eficiencia de la Proteína (PER) para tener la certeza de que las fuentes empleadas en el ensayo preliminar proporcionarían la respuesta esperada como fuentes de proteína. Dicho índice biológico se muestran en la tabla 16, éstos mostraron un buen coeficiente de correlación con respecto a valores teóricos, con un nivel de significancia de $p < 0.005$.

**TABLA NO. 16. RELACIÓN DE EFICIENCIA DE PROTEÍNA (PER)
OBTENIDOS EN EL ENSAYO PRELIMINAR.**

ÍNDICES BIOLÓGICOS		
	PER AJUSTADO	PER REPORTADO
HUEVO EN POLVO	3.90	3.92
LECHE EN POLVO	3.35	3.09
CASEÍNA	2.50	2.68
SOYA	1.80	2.32
GARBANZO	1.55	1.68
TRIGO	1.56	1.53
AJONJOLÍ	1.19	1.77
LENTEJA	1.10	0.93
GELATINA	-1.30	-1.25

1) La correlación entre datos teóricos y experimentales mostró un buen coeficiente de correlación ($r = 0.98190235$), con un nivel de significancia $p < 0.005$.

2) El C.V. fue menor al 15 %

Desde un principio se quería tener la certeza de que el huevo y la leche deshidratados no tuvieran daños, principalmente por el tratamiento térmico al que son sometidas para su obtención, pues sabemos que en general los tratamientos térmicos y químicos alteran el valor nutritivo de un alimento; sin embargo, su respuesta fue la esperada (tabla 16), por lo tanto su uso se continuó en el ensayo final. En el caso del ajonjolí, en la bibliografía se reporta un PER (1.77) superior al reportado para el garbanzo y el trigo, hecho que no ocurrió experimentalmente ya que se sabía de antemano el tratamiento térmico al cual fue sometido y, por consiguiente, el daño que representaría en el aspecto nutritivo, por lo que no fue sorprendente obtener un PER menor al reportado (1.19) ya que el ajonjolí se seleccionó desde un principio como una fuente de proteína de baja calidad, por lo que su respuesta fue la esperada en cuanto a su biodisponibilidad como fuente de proteína de baja calidad; por lo tanto, se continuó su uso en el ensayo final.

Una vez corroborada la respuesta biológica adecuada de las fuentes de proteína utilizadas en el ensayo preliminar, se obtuvieron las concentraciones de nitrógeno de los diferentes órganos y tejidos mencionados en la metodología (tabla 10), estas concentraciones de nitrógeno (tabla 17) fueron sometidos a un análisis estadístico completo, que más adelante se reporta (ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO PRELIMINAR), contando con 40 observaciones por cada uno de los tejidos analizados, además del carcass, para así derivar un Modelo Predictor a partir del conjunto de datos experimentales.

**TABLA 17. CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO (%) EN ÓRGANOS Y TEJIDOS¹
ENSAYO PRELIMINAR**

DIETA	CONCENTRACIÓN DE NITROGENO (%)						
	CARCASS	RIÑÓN	CORAZÓN	HÍGADO	INTESTINO	PATAS ²	BAZO
HUEVO	2.8234	2.7821	2.8558	2.5553	2.5481	4.1375	2.9982
LECHE	2.6280	2.8921	2.8044	2.5898	2.2026	4.2593	3.1451
CASEINA	2.6969	2.6874	2.7903	2.5953	2.3779	3.8673	2.8948
SOYA	2.7603	2.8933	2.7605	2.5195	2.6744	3.7325	*
GARBANZO	2.7373	3.0786	2.8144	2.6265	2.6502	3.4132	*
TRIGO	2.4428	2.5548	2.7799	2.3093	2.5328	4.1418	*
AJONJOLI	2.7652	2.8597	2.8456	2.7805	2.3890	4.1337	*
LENTEJA	2.7579	2.7054	2.9595	2.5145	1.9595	3.7299	3.2523
GELATINA	2.6239	2.4702	2.8406	2.6540	2.5588	3.9779	3.9455
DLN	2.7984	2.6882	3.0387	2.1680	2.3312	4.0882	3.3250

* Valor no determinado.

1) El valor corresponde al promedio de los datos, en base húmeda.

A) Patas delanteras, tanto la izquierda como la derecha; se homogeneizaron.

ENSAYO FINAL

Así como fue importante conocer la composición proteínica de las fuentes de proteína al momento de su selección, también se consideró importante realizar nuevamente el análisis de proteína de las dietas elaboradas en el ensayo final (tabla 18), así como su contenido calórico (tabla 19); ésto con la finalidad de obtener datos reproducibles y comparables. La concentración de proteína de las dietas, comparándolas con la de su fuente original correspondiente, se aprecian en la figura 5.

TABLA 18. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LAS DIETAS DEL ENSAYO FINAL¹.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LA DIETA (%)	
HUEVO	10.12
LECHE	10.72
CASEÍNA	11.39
SOYA	9.20
GARBANZO	10.89
TRIGO	8.71
AJONJOLI	9.01
LENTEJA	10.66
GELATINA	8.98

1) Todos los resultados se realizaron por duplicado, con una variabilidad entre el duplicado menor al 5.0 %.

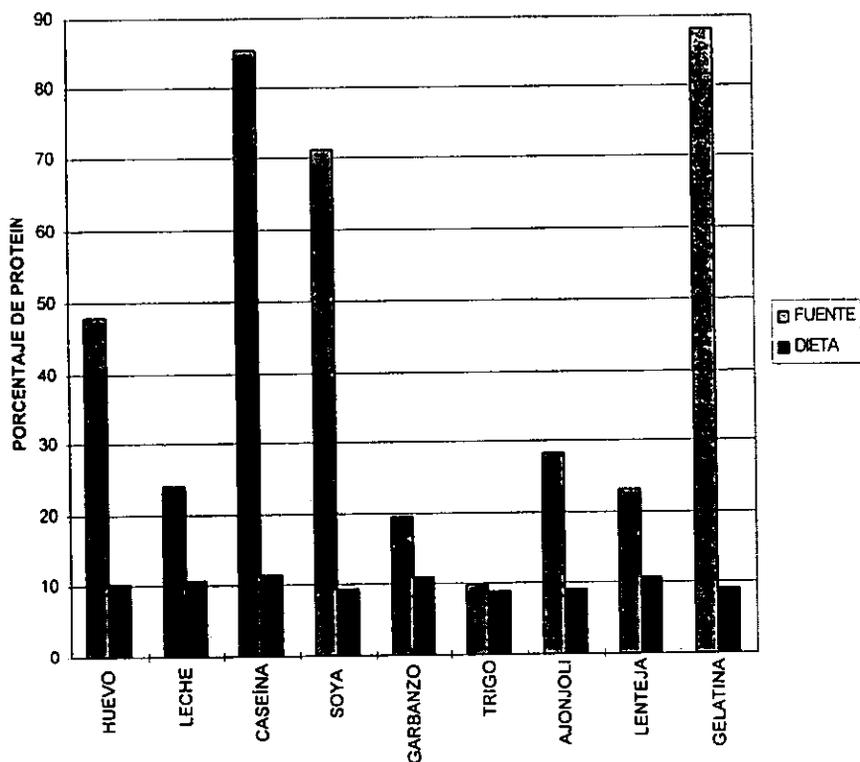


FIGURA 5. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE FUENTES Y DIETAS DEL ENSAYO FINAL.

El contenido calórico de las dietas (tabla 19) es homogéneo, no existe diferencia significativa entre ellas. Hay que hacer notar que la dieta de gelatina presentó un contenido calórico por abajo de lo requerido; sin embargo, esto no afectó nuestro ensayo, como lo veremos más adelante en la discusión.

TABLA 19. CONTENIDO CALÓRICO DE LAS DIETAS DEL ENSAYO FINAL.

Contenido calórico ^{1,2} (Kcal / 100 g de muestra)	
	DIETA
HUEVO EN POLVO	436.16
LECHE EN POLVO	452.89
CASEÍNA	422.45
SOYA	428.24
GARBANZO	443.99
TRIGO	421.34
AJONJOLÍ	439.40
LENTEJA	440.58
GELATINA	413.79

- 1) La curva estandar de ácido benzoico mostró un buen coeficiente de correlación ($r=0.993877891$), con un nivel de significancia $p < 0.005$.
- 2) Todos los resultados se realizaron por duplicado, con una diferencia entre el duplicado no mayor del 15.0%.

Las pruebas biológicas del ensayo final (PER, NPR Y NPU) se realizaron en las mismas condiciones experimentales en las que se llevó a cabo el ensayo preliminar (descritas en la metodología: Pruebas biológicas); es decir, estandarizando el nivel de las proteínas, la especie y sexo del animal, la edad de los mismos, la duración del ensayo, el método de alimentación, la temperatura y las condiciones de humedad; además, se contó con la experiencia en la manipulación y obtención de tejidos de los animales de experimentación que se obtuvo en el ensayo preliminar.

En la tabla 20 se puede observar el peso de cada una de las ratas empleadas en la prueba biológica, así como su distribución en cada uno de los 10 lotes de 6 ratas cada uno. El peso promedio de las ratas fue de 43.4 ± 3.03 , con un coeficiente de variabilidad menor de 7.

TABLA 20. PESO DE LAS RATAS DEL ENSAYO FINAL.

Peso de las ratas (gramos)										
Lote	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dieta	Garb.	Lent.	Cas.	Leche	Soya	Gelat.	Huevo	DLN	Ajon.	Trigo
Rata 1	38.1	38.2	38.6	38.8	38.9	39.1	39.8	40.0	40.0	40.0
Rata 2	42.0	41.9	41.5	41.2	41.2	41.2	41.2	40.0	40.0	40.0
Rata 3	42.1	42.3	42.4	42.5	42.6	42.6	43.2	43.2	43.5	43.6
Rata 4	44.5	44.4	44.3	44.0	43.9	43.8	43.8	43.7	43.7	43.6
Rata 5	44.5	44.7	44.8	44.8	44.8	45.3	45.3	45.3	45.5	46.1
Rata 6	49.8	49.5	48.8	48.6	48.5	48.5	48.3	47.8	47.1	46.5
Prom. Global					43.4 ± 3.03					
C.V.					6.99					

Las dietas se elaboraron de acuerdo a la A.O.A.C., salvo dos modificaciones, la de la celulosa y el agua, ésto debido a que las cuatro fuentes vegetales empleadas en el ensayo contienen más del 1% de fibra cruda, es por ésto que se aumento a 3% como máximo contenido de celulosa, por consiguiente, se redujo hasta 4% el contenido de agua. En la tabla 21 se encuentran las cantidades que se pesaron de cada uno de los ingredientes, tomando como base 100 gramos de dieta (base húmeda). En el caso del trigo, como su contenido de proteína (tabla 15) fue menor al 10%, el mayor ingrediente de la dieta fue la fuente misma, por lo que ya no se agregó otros ingredientes, tales como: la celulosa, agua y almidón de maíz. Aún así excedimos el 100% pues fue necesario agregar la mezcla de sales y vitaminas, que son esenciales.

TABLA 21. ELABORACIÓN DE DIETAS DEL ENSAYO FINAL.

DIETA	INGREDIENTES (gramos / 100 gramos de dieta) ¹						
	FUENTE	ACEITE DE MAIZ	MEZCLA DE SALES	MEZCLA DE VIT.	CELULOSA ²	AGUA ³	ALMIDÓN DE MAIZ
HUEVO	20.89	0.42	4.18	1.00	3.00	3.46	67.04
LECHE	42.39	---	2.51	1.00	3.00	2.97	48.13
CASEINA	11.94	7.98	4.94	1.00	3.00	3.69	67.45
SOYA	12.84	7.87	3.75	1.00	3.00	3.41	68.12
GARBAN.	51.39	5.41	3.46	1.00	1.56	0.35	36.83
TRIGO	95.73	5.17	3.25	1.00	---	---	---
AJONJOLI	29.90	1.03	3.50	1.00	1.53	2.20	60.83
LENTEJA	43.52	7.46	4.12	1.00	1.57	---	42.32
GELATINA	10.07	7.98	4.81	1.00	3.00	3.65	69.49
DLN	---	8.00	5.00	1.00	3.00	4.00	79.00

1) Base húmeda.

2) Se modificó la fórmula para obtener la cantidad necesaria de celulosa, de acuerdo a la siguiente fórmula: $3 - (X * \% \text{fibra cruda} / 100)$.

3) Se modificó la fórmula para obtener la cantidad necesaria de agua, de acuerdo a la siguiente fórmula: $4 - (X * \% \text{humedad} / 100)$.

Relación de Eficiencia de la Proteína (PER).

En la tabla 22 se observan los valores de PER del ensayo final, la correlación entre los datos reportados (F.A.O., 1970) y los experimentales fue buena ($r=0.9923571$), con un nivel de significancia $p<0.005$.

TABLA 22. RELACIÓN DE EFICIENCIA PROTEÍNICA (PER) DEL ENSAYO FINAL.

	P E R ¹	
	AJUSTADO	REPORTADO ²
HUEVO EN POLVO	3.47 ± 0.12	3.92
LECHE EN POLVO	2.98 ± 0.09	3.09
CASEÍNA	2.50 ± 0.25	2.68
SOYA	1.89 ± 0.28	2.32
GARBANZO	1.73 ± 0.27	1.68
TRIGO	1.44 ± 0.20	1.53
AJONJOLÍ	1.32 ± 0.11	1.77
LENTEJA	0.67 ± 0.07	0.93
GELATINA	-1.22 ± 0.16	-1.25

1) La correlación entre el PER reportado y el PER ajustado fue significativa ($r = 0.9923571$) con un nivel de significancia $p < 0.005$.

2) FAO, 1970.

Las proteínas de origen vegetal contienen fibra, componente que afecta la digestibilidad y la absorción de muchos elementos nutritivos, incluyendo la proteína, pues incrementan la eliminación de nitrógeno fecal; además de ser deficientes en metionina, cisteína y lisina, principalmente. Por otro lado, la gelatina, a pesar de ser una proteína de origen animal, fue la fuente que menor calidad nutritiva presentó ya que carece de un aminoácido indispensable (triptofano), a pesar de contener los 19 aminoácidos indispensables restantes, teniendo entonces el PER más bajo, lo cual es bien conocido. Como era de esperarse, la leche presentó un PER mayor que la caseína pues contiene proteínas de mayor calidad, como son la albúminas y globulinas.

Si observamos las curvas de crecimiento de las diferentes dietas (figura 6), apreciamos claramente el diferente incremento en peso logrado por cada una de las dietas, lo que nos muestra el amplio espectro de calidad proteínica utilizado; el huevo logró el mayor incremento en peso a lo largo de los 21 días, mientras que la

gelatina obtuvo el menor incremento en peso, llegando incluso hasta valores negativos después del tercer día.

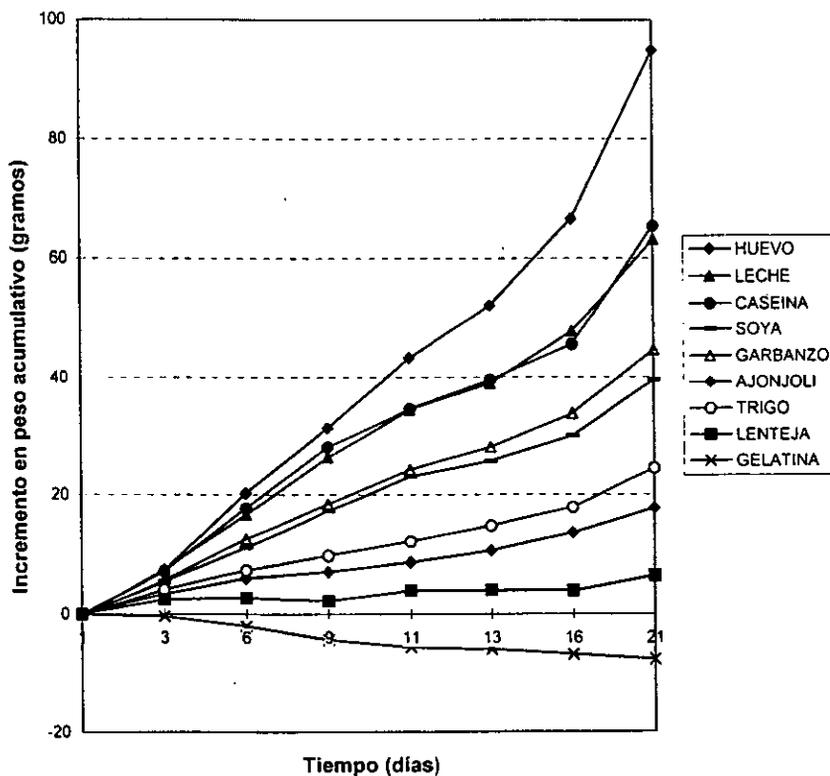


FIGURA 6. CURVAS DE CRECIMIENTO DEL ENSAYO FINAL.

Como se observa, las fuentes de proteína de origen animal, tales como el huevo y la leche, son una excelente fuente de aminoácidos, mientras que proteínas deficientes en algún aminoácido, como la gelatina que es deficiente en triptófano, limitan la disponibilidad del resto de las aminoácidos indispensables, trayendo como consecuencia una reducción en su incremento en peso. Toda fuente de

proteína insuficiente en uno o más aminoácidos indispensables provoca que el crecimiento se reduzca o incluso este no se presente. Cuando un animal en experimentación no obtiene los aminoácidos necesarios para incrementar su peso recurre a su proteína corporal para seguir subsistiendo, ésto ocurrió en el caso de la gelatina y lógicamente en la DLN pues se obtuvieron valores negativos de incremento en peso. La leche y la caseína reflejaron incrementos en peso similares durante todo el ensayo, así como el garbanzo y la soya. El trigo y el ajonjolí tendieron a mostrar semejanza en su incremento. El incremento en peso de la lenteja fue menor a todos los mencionados anteriormente, pero mucho mayor al de la gelatina. El crecimiento es un índice sensible a la disponibilidad de aminoácidos, por lo que lo usamos para evaluar el efecto global de las dietas.

Relación Neta de la Proteína (NPR).

A partir del ensayo final también se obtuvo otro índice biológico: la Relación Neta de la Proteína (NPR).

TABLA 23. RELACIÓN NETA DE PROTEÍNA (NPR) DEL ENSAYO FINAL.

	N P R	
	AJUSTADO	REPORTADO
HUEVO EN POLVO	4.70 ± 0.32	*
LECHE EN POLVO	4.66 ± 0.19	3.65
CASEÍNA	4.10 ± 0.28	4.01
SOYA	3.66 ± 0.30	3.78
GARBANZO	3.54 ± 0.56	4.13
TRIGO	3.02 ± 0.37	1.99
AJONJOLÍ	2.69 ± 0.15	*
LENTEJA	2.29 ± 0.41	*
GELATINA	0.84 ± 0.15	*

* Valor teórico no encontrado en la bibliografía (F.A.O., 1970).

Las dietas que presentaron el mayor PER y NPR fueron las correspondientes a fuentes de proteína de origen animal, éstas tienen mejor calidad nutritiva en comparación con las fuentes vegetales que son deficientes en lisina y azufrados, principalmente, como ya es conocido. Hay que considerar que algunas fuentes de origen vegetal tienen un buen perfil de aminoácidos, sin embargo, no son superiores a las de origen animal, a excepción de la gelatina. Algunos aislados de proteína de origen vegetal no son superiores a las proteínas de origen animal, como es el caso del aislado de proteína de soya (PER=1.86) y del ajonjolí (PER=1.44), ésto puede deberse a que las proteínas de origen animal tienen un mejor perfil de aminoácidos indispensables. Realizando la correlación entre los índices NPR y PER ajustados, tenemos que si es significativa dicha correlación ($r = 0.98903302$), con un nivel de significancia $p < 0.005$.

Índices Químicos de calidad proteínica.

Si consideramos los índices químicos, tales como la calificación química (S.Q.) e índice de aminoácidos indispensables (I.A.A.E.) (tabla 24), determinados ambos a partir del contenido de aminoácidos indispensables (tabla 14), observamos que existen pequeñas variaciones entre el S.Q. experimental y el S.Q. reportado de ciertas fuentes de proteína; a pesar de ello, la correlación entre ambas fue buena ($r = 0.98362629$). Los valores experimentales son concordantes con la bibliografía, con excepción de la gelatina. No obstante, hay muchos factores que pueden influir en la composición de una fuente alimenticia, nos referimos a factores intrínsecos tales como: el suelo de cultivo, la alimentación, el clima, la variedad, etc., estos factores influyen en la composición de una determinada fuente de proteína donde ciertos aminoácidos, especialmente la metionina, cistina y triptofano, presentan un coeficiente de variabilidad entre 20 y 30%, en cuanto a su concentración (F.A.O., 1970).

TABLA 24. INDICES QUÍMICOS DEL ENSAYO FINAL.

FUENTE	ÍNDICES QUÍMICOS ¹			AMINOÁCIDO	
	I.A.A.E. ²	S. Q. ³	S. Q. TEÓRICO	LIMITANTE	AMINOÁCIDO LIMITANTE TEÓRICO
HUEVO	101.79	81.20	100	S-C ⁴	---
LECHE	80.35	61.07	69	S-C	S-C
CASEÍNA	92.03	54.68	59	S-C	S-C
AISLADO SOYA	72.71	57.45	62	S-C	S-C
GARBANZO	73.19	54.36	53	S-C	S-C
TRIGO	56.84	62.76	68	Lisina	Lisina
AJONJOLÍ	62.29	66.68	63	Lisina	Lisina
LENTEJA	67.10	41.51	41	S-C	S-C
GELATINA	60.50	15.86	0	Triptofano	---

1) La correlación entre S.Q. reportado y el experimental fue significativa ($r= 0.98362629$), con un nivel de significancia $p<0.005$.

2) Patrón de referencia: huevo entero.

3) Patrón de referencia: F.A.O., 1970.

4) S-C indica aminoácidos azufrados, a saber metionina y cisteína.

En el caso de la leche, observamos que su I.A.A.E. fue menor al de la caseína; sin embargo, el S.Q. de la leche si fue mayor al de la caseína. Debemos considerar que el S.Q. es un índice más confiable que el I.A.A.E. pues el S.Q. utiliza como patrón de referencia la propuesta por la F.A.O., patrón que se adecua a las necesidades de todos los seres humanos; en tanto que el huevo, patrón de referencia utilizado para determinar el S.Q., no representa los requerimientos de todos los seres humanos.

Como era de esperarse, el S.Q. y el I.A.A.E. presentan valores más altos para el caso de las proteína de origen animal en comparación a las de origen vegetal, de estas últimas el garbanzo obtuvo el mayor valor (73.19); la mayoría de las fuentes son deficientes en aminoácidos azufrados (S-C): metionina y cisteína,

exceptuando al trigo que es deficiente en lisina. Hay que resaltar que la gelatina presentó un S.Q. de 15.68, siendo que este valor debería de haber sido nulo, ésto se debió a que se empleó gelatina comercial, la cual presentó una concentración de triptofano de 11.65 mg/g N, concentración que es nula en el caso de gelatina U.S.P. Una gelatina de origen comercial puede presentar cantidades mínimas de triptofano ya que durante el proceso de su elaboración cabe la posibilidad de quedar trazas de tejido muscular adherido a huesos o despojos utilizados para su elaboración. Existió concordancia con los datos reportados en la bibliografía (F.A.O., 1970) en la determinación del aminoácido limitante, con excepción de la gelatina por razones antes mencionadas.

UTILIZACIÓN NETA PROTEÍNICA (NPU) ORIGINAL

En la tabla 25 se observa el promedio de las concentraciones de nitrógeno retenido en el carcass (%N carcass) obtenido a partir del ensayo final de todas las dietas empleadas, estas concentraciones de nitrógeno en el carcass se sometieron a un análisis de varianza, el cual reveló que si hay diferencia significativa en las concentraciones de nitrógeno en el carcass entre los grupos, por lo que podemos decir que tanto el peso de las ratas como la concentración de nitrógeno en el carcass estuvieron afectados por la calidad de las dietas. Con el %N en el carcass y otros datos contenidos en la misma tabla (peso final y alimento ingerido) se calculó el nitrógeno ingerido y nitrógeno corporal del carcass (Nc), necesarios para calcular el NPU a partir de la concentración de nitrógeno en el carcass, empleándose las siguientes fórmulas (ver metodología: Utilización Neta de la Proteína (NPU) original):

$$\text{NPU original} = [(\text{Nc}_p - \text{Nc}_{\text{DLN}}) / \text{N ingerido}_p] \times 100$$

$$\text{Nc} = \text{N corporal} = (\text{Peso final} \times \% \text{N en carcass}) / 100$$

$$\text{N ingerido} = \text{Nitrógeno ingerido}$$

$$= (\text{Alimento ingerido} \times \text{Proteína de dieta}) / (\text{Factor} \times 100) \text{EI}$$

TABLA 25. DATOS PARA CALCULAR EL NPU ORIGINAL DEL ENSAYO FINAL ¹.

	PESO FINAL (g)	%N DEL CARCASS ²	ALIMENTO INGERIDO (g)	NITROGENO INGERIDO (%)	NITROGENO CORPORAL Nc (%)
HUEVO	137.78	2.8550	147.94	2.3956	3.9418
LECHE	108.56	2.8620	104.06	1.7480	3.1004
CASEINA	108.83	2.8500	105.48	1.8841	3.1041
SOYA	84.96	2.8843	103.64	1.6701	2.4511
GARBANZO	20.38	2.9244	88.24	1.5381	2.6402
TRIGO	12.83	2.6476	85.99	1.2852	1.8080
AJONJOLI	10.26	2.7009	74.42	1.2652	1.7078
LENTEJA	2.88	2.8767	55.16	0.9410	1.4712
GELATINA	-1.95	2.5422	35.73	0.5784	0.9098

1) Valores promedio. 2) La concentración de nitrógeno se calculó en base húmeda.

El NPU original del ensayo final se muestra en la tabla 26, junto con el NPU reportado en la bibliografía (F.A.O., 1970), ambas se correlacionan de manera significativa ($r=0.98945641$).

TABLA 26. UTILIZACIÓN NETA PROTEÍICA (NPU) ORIGINAL DEL ENSAYO FINAL.

DIETA	NPU original	NPU reportado
HUEVO	91.6	93.5
LECHE	78.0	81.6
CASEINA	72.6	72.1
SOYA	56.4	61.4
GARBANZO	54.6	52.0
TRIGO	48.5	40.3
AJONJOLI	41.8	46.2
LENTEJA	30.7	29.7
GELATINA	7.8	2.5

1) La correlación entre el NPU reportado y el NPU original mostró un buen coeficiente de correlación ($r=0.98945641$), on un nivel de significancia $p < 0.005$ (F.A.O., 1970).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO PRELIMINAR

A continuación se reporta el análisis estadístico al cual fue sometido las diferentes concentraciones de nitrógeno (%) en los órganos y tejidos obtenidos en el ensayo preliminar (ver tabla 17), para así derivar un Modelo Predictor a partir del conjunto de datos experimentales, que nos permita obtener el % nitrógeno en el carcass pero calculado. El Modelo Predictor se derivó realizando una Regresión Multivariable por Etapas, la cual puede realizarse con cualquier modelo matemático, en función de la complejidad que se quiera en la ecuación final, en este caso se empleó el modelo cuadrático completo, éste incluyó los términos lineales, los productos de éstos de dos en dos y los cuadrados de aquéllos.

Una vez derivado el Modelo Predictor, el paso siguiente fue investigar la calidad de tal Modelo, ya que un modelo puede contener uno o varios defectos, tales como errores experimentales, los cuales son muy útiles identificarlos pues representan una pieza de información muy valiosa del fenómeno en estudio; también están los errores propios de la experimentación y cuyo conocimiento nos puede conducir a desarrollar mejoras en nuestros métodos de observación. Por otro lado están las faltas de ajuste por modelo matemático inadecuado y la acción de factores influyentes espúreos (falsos que no tienen significado y uno no se da cuenta de ello) y desconocidos que nos permiten proyectar el futuro de la investigación de una manera metódica y segura. En el ensayo preliminar se derivó un Modelo Predictor principalmente para eliminar aquellos órganos que no guardaron correlación con el carcass, en cuanto a concentración de nitrógeno, obteniéndose el siguiente Modelo:

$$\%N \text{ carcass calculado} = 1.6781 + 0.3121 RC$$

Donde: %N carcass calculado = concentración de nitrógeno en carcass
calculado, en %.

R = concentración de nitrógeno en los riñones, en %.

C = concentración de nitrógeno en el corazón, en %.

Estadística de Durbin-Watson (D.W.) = 3.550186 (Fabila, 1998).

La ecuación consta de un término constante y una variable que involucra únicamente a los riñones y al corazón, cuyo coeficiente de regresión (0.3121) presentó un error estandar de 0.0359, el cual nos indica la confiabilidad del coeficiente. En otras palabras, el coeficiente de regresión calculado a lo largo de todos los datos cae 95% de las veces dentro de $\pm 2(0.0359)$ del valor promedio, pues este tipo de errores siguen una distribución normal.

Un índice muy importante y sensible para detectar autocorrelación, es la estadística de Durbin-Watson (D.W.). La interpretación de este índice (d) es la siguiente:

- Si el índice D.W. cae dentro del rango $1.5 \leq d \leq 2.5$ los datos son normales libres de autocorrelación .
- Valores de $d < 1.5$ señalan autocorrelación positiva.
- Valores de $d > 2.5$ señalan autocorrelación negativa.

Una autocorrelación positiva significa que el error experimental tiende a aumentar conforme más se experimenta, en tanto que una negativa significa que ese error disminuye, seguramente por aprendizaje del investigador; en nuestro caso hay entre los residuos una autocorrelación negativa (D.W. = 3.550186); o sea, que a un cierto residuo tendió a seguirle otro menor que él. Esto indica que el experimentador estuvo aprendiendo a hacer mejor las cosas (Fabila, 1998).

La ecuación obtuvo un porcentaje de explicación de 26.29% (%explicación), este porcentaje representa el porcentaje total del fenómeno que logra ser explicado con los factores; en otras palabras, el 26.29% de los puntos totales se predicen de manera confiable mediante el Modelo; el resto de este porcentaje pertenece a otros factores explicativos no incluidos en la ecuación, tales como el diferente metabolismo de los animales entre sí. El %explicación obtenido por el Modelo fue confiable, considerando que se trata de una prueba biológica.

Ahora lo más indicado para investigar la calidad del Modelo es probar cómo trabaja dicho Modelo prediciendo nuestros propios valores experimentales. Esto

es, sustituyendo en dicho modelo los niveles de los factores y calculando otras tantas Y -calculada (Y_c). Estos valores se comparan con los correspondientes de las Y -observada (Y). Esta comparación se hace tradicionalmente estudiando las diferencias o residuos:

$$d_i = Y_i - Y_{c_i} \quad \text{donde: } i = 1, m \text{ (número total de datos)}$$

Estas diferencias o residuos son los que de alguna forma, contienen la historia que nos permite diagnosticar la bondad de nuestro modelo. A partir del análisis residual del Modelo, podemos obtener una gráfica de errores de pronóstico (figura 7) dado en términos de error experimental, el cual como sabemos se origina de nuestra impotencia de medir exactamente variables físicas, que son errores inherentes al experimento que siguen una distribución normal y que, además, refleja la confiabilidad de las determinaciones realizadas. Muchas mediciones que se hacen en forma natural se asemejan a una curva normal porque la naturaleza tiende a promediar los efectos de las diversas variables que intervienen en una respuesta determinada. Si la variabilidad es muy alta, esto es, que no caiga dentro de ± 2 desviaciones estándar, significa que no existe control sobre el proceso. Según la figura 7, el 95% de las mediciones caen dentro de ± 2 desviaciones estándar promedio, lo cual significa que los errores sí están siguiendo una distribución normal, lo cual refleja un buen manejo experimental en todos los aspectos,

Del análisis estadístico preliminar, se descartó el uso de las pata delanteras, el bazo, intestino e hígado como posibles órganos para simplificar el método original. Por lo tanto, en el ensayo final sólo se manejó el % nitrógeno de los dos órganos antes señalados (corazón y riñones), además de la concentración de nitrógeno en el carcass (% N carcass), que se empleará como referencia.

OBS	Y-OBS	Y-CAL	RESIDUO	I	I	I	I	I	I	I
1	2.8863	2.6893	0.1970	I	+	+	+	I	+	X
2	2.7582	2.6773	0.0809	I	+	+	+	I	X	+
3	2.8054	2.7541	0.0513	I	+	+	+	I	X	+
4	2.8436	2.7790	0.0646	I	+	+	+	I	X	+
5	2.6087	2.7250	-0.1163	I	+	+	X	I	+	+
6	2.7277	2.7347	-0.0070	I	+	+	+	X	+	+
7	2.5754	2.7409	-0.1655	I	+	+	X	I	+	+
8	2.6000	2.8017	-0.2017	I	+	X	+	I	+	+
9	2.6006	2.7028	-0.1022	I	+	+	X	I	+	+
10	2.6286	2.6730	-0.0444	I	+	+	+	X	I	+
11	2.7580	2.6901	0.0679	I	+	+	+	I	X	+
12	2.8005	2.6101	0.1904	I	+	+	+	I	+	X
13	2.7157	2.7618	-0.0461	I	+	+	+	X	I	+
14	2.8574	2.6387	0.2187	I	+	+	+	I	+	X
15	2.6624	2.7636	-0.1012	I	+	+	X	I	+	+
16	2.8058	2.7703	0.0355	I	+	+	+	I	X	+
17	2.6782	2.7123	-0.0341	I	+	+	+	X	I	+
18	2.7691	2.8010	-0.0319	I	+	+	+	X	I	+
19	2.8002	2.7255	0.0747	I	+	+	+	I	X	+
20	2.8472	2.6533	0.1939	I	+	+	+	I	+	X
21	2.2319	2.5391	-0.3072	I	X	+	+	I	+	+
22	2.3373	2.6176	-0.2803	I	X	+	+	I	+	+
23	2.5871	2.6176	-0.0305	I	+	+	+	X	I	+
24	2.6149	2.6968	-0.0819	I	+	+	+	X	I	+
25	2.7201	2.8165	-0.0964	I	+	+	+	X	I	+
26	2.8654	2.8081	0.0573	I	+	+	+	I	X	+
27	2.6353	2.6854	-0.0501	I	+	+	+	X	I	+
28	2.8399	2.7046	0.1353	I	+	+	+	I	+	X
29	2.6390	2.7363	-0.0973	I	+	+	+	X	I	+
30	2.8221	2.7668	0.0553	I	+	+	+	I	X	+
31	2.7537	2.7224	0.0313	I	+	+	+	I	X	+
32	2.8166	2.7061	0.1105	I	+	+	+	I	X	+
33	2.4619	2.5841	-0.1222	I	+	+	X	I	+	+
34	2.7687	2.5749	0.1938	I	+	+	+	I	+	X
35	2.5667	2.6477	-0.0810	I	+	+	+	X	I	+
36	2.6983	2.6167	0.0816	I	+	+	+	I	X	+
37	2.8450	2.8335	0.0115	I	+	+	+	I	X	+
38	2.9430	2.8549	0.0881	I	+	+	+	I	+	X
39	2.6585	2.6316	0.0269	I	+	+	+	I	X	+
40	2.7470	2.7162	0.0308	I	+	+	+	I	X	+

-3σ -2σ -1σ 0 +1σ +2σ +3σ

FIGURA 7. ANÁLISIS RESIDUAL Y GRÁFICA DE ERRORES DE PRONÓSTICO DEL ENSAYO PRELIMINAR.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO FINAL

En el ensayo final se contaron con 120 datos por cada órgano seleccionado (riñones y corazón) (tabla 27).

TABLA 27. CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO (%) EN CORAZÓN Y RIÑONES DEL ENSAYO FINAL.

DIETA	CONCENTRACIÓN DE NITROGENO (%) ¹	
	RIÑONES (R)	CORAZÓN (C)
HUEVO	2.4390	2.3612
LECHE	2.1286	2.3339
CASEINA	2.5423	2.3365
SOYA	2.5959	2.5704
GARBANZO	2.3268	2.4585
TRIGO	2.4211	2.6178
AJONJOLI	2.6427	2.4292
LENTEJA	2.4737	2.3070
GELATINA	2.4831	2.4545
DLN	2.4518	2.4880

1) La concentración de nitrógeno se calculó en base húmeda. Son valores promedio.

En la tabla 27 se muestran los promedios de los %N contenidos en el corazón y en los riñones de todas las dietas empleadas, estas concentraciones de nitrógeno se sometieron a un análisis de varianza, el cual reveló que si hay diferencia significativa en las concentraciones de nitrógeno, tanto en el corazón como en los riñones entre los grupos. Se derivaron 4 Modelos, abarcando cada vez un mayor número de datos, seleccionándolos aleatoriamente. De la tabla 28 podemos definir que el Modelo que mejor analizó el fenómeno fue el tercero, pues tuvo el mayor %explicación, abarcando además dos variables significativas (C y R), representado así la mayor parte de los datos.

TABLA 28. MODELOS PREDICTORES DEL ENSAYO FINAL.

MODELO PREDICTOR	NUMERO DE OBSERVACIONES	NUMERO DE VARIABLES ABARCADAS ¹	EXPLICACIÓN DEL MODELO (%)
1	20	R	16.05
2	38	R, C	23.66
3	53	R, C	24.47
4	83	R	8.72

1) R = riñón y C = corazón.

Este %explicación del tercer modelo nos indica que el 24.47% de los puntos totales se predicen de manera confiable mediante el tercer modelo, el cual se definió de la siguiente manera:

$$\%N \text{ carcass calculado} = 9.0565 - 0.1010 C - 4.4868 R + 0.8254 R^2$$

Donde: %N carcass calculado = concentración de nitrógeno en el carcass calculado, en %.

R = concentración de nitrógeno en los riñones, en %.

C = concentración de nitrógeno en el corazón, en %.

Estadístico D.W. = 1.139109 (Fabila, 1998)

La ecuación consta de un término constante y tres variables que involucran únicamente a los riñones y al corazón. Cabe mencionar que el %explicación del Modelo Predictor final fue ligeramente menor al obtenido en el ensayo preliminar. La estadística de D.W. del último Modelo nos señaló autocorrelación positiva de nuestros datos, indicándonos que el error experimental tendió a aumentar conforme más se experimentaba, debido probablemente a un efecto causado por el deterioro de las muestras ya que el análisis para obtener la concentración de nitrógeno de todas las muestras no se realizó en un sólo día, a pesar de que su almacenamiento fue adecuado (refrigeración); otra posible causa pudo deberse a un progresivo desajuste de los aparados de medición. El análisis residual correspondiente al Modelo Predictor del ensayo final se aprecia en la figura 8.

2	2.9300	2.8062	0.1238	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
3	3.1000	2.8804	0.2196	I	+	+	+	+	I	+	+	X	+	+	I
4	2.8400	2.9607	-0.1207	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
5	2.6900	2.7979	-0.1079	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
6	2.8400	2.7937	0.0463	I	+	+	+	+	I	X	+	+	+	+	I
7	2.8200	2.7109	0.1091	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
8	2.9000	2.8176	0.0824	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
9	2.7400	2.8266	-0.0866	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
10	2.8200	2.8902	-0.0702	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
11	2.5400	2.7137	-0.1737	I	+	+	X	+	I	+	+	+	+	+	I
12	2.6800	2.6354	0.0446	I	+	+	+	+	I	X	+	+	+	+	I
13	2.6200	2.7334	-0.1134	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
14	2.6400	2.7758	-0.1358	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
15	2.8200	2.8683	-0.0483	I	+	+	+	+	X	I	+	+	+	+	I
16	2.8700	2.8278	0.0422	I	+	+	+	+	I	X	+	+	+	+	I
17	2.4300	2.7747	-0.3447	I	X	+	+	+	I	+	+	+	+	+	I
18	2.8600	2.7070	0.1530	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
19	2.7700	2.7942	-0.0242	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
20	3.0500	2.7992	0.2508	I	+	+	+	+	I	+	+	X	+	+	I
21	2.7700	2.7459	0.0241	I	+	+	+	+	I	X	+	+	+	+	I
22	2.9400	2.7903	0.1497	I	+	+	+	+	I	+	+	X	+	+	I
23	3.1000	2.8794	0.2206	I	+	+	+	+	I	+	+	+	X	+	I
24	3.1600	2.9147	0.2453	I	+	+	+	+	I	+	+	+	X	+	I
25	2.8100	2.7681	0.0419	I	+	+	+	+	I	X	+	+	+	+	I
26	2.8100	2.7552	0.0548	I	+	+	+	+	I	X	+	+	+	+	I
27	2.8300	2.7135	0.1165	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
28	2.8100	2.8753	-0.0653	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
29	2.8100	2.7701	0.0399	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
30	2.6000	2.7268	-0.1268	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
31	2.7800	2.9717	-0.1917	I	+	+	X	+	I	+	+	+	+	+	I
32	2.6900	2.7996	-0.1096	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
33	2.6200	2.7194	-0.0994	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
34	2.6800	2.8074	-0.1274	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
35	2.7300	2.7128	0.0172	I	+	+	+	+	I	X	+	+	+	+	I
36	2.4600	2.7556	-0.2956	I	X	+	+	+	I	+	+	+	+	+	I
37	2.7100	2.7494	-0.0394	I	+	+	+	+	X	I	+	+	+	+	I
38	2.9000	2.8582	0.0418	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
39	3.0000	2.8112	0.1888	I	+	+	+	+	I	+	+	X	+	+	I
40	2.8200	2.8030	0.0170	I	+	+	+	+	I	X	+	+	+	+	I
41	2.7100	2.9016	-0.1916	I	+	+	X	+	I	+	+	+	+	+	I
42	2.8300	2.8070	0.0230	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
43	2.3800	2.7187	-0.3387	I	X	+	+	+	I	+	+	+	+	+	I
44	2.9300	2.7852	0.1448	I	+	+	+	+	I	+	+	X	+	+	I
45	2.8200	2.7006	0.1194	I	+	+	+	+	I	+	+	X	+	+	I
46	2.8200	2.8532	-0.0331	I	+	+	+	X	I	+	+	+	+	+	I
47	3.0300	3.0125	0.0175	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
48	2.6600	2.6637	-0.0037	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
49	2.7200	2.6651	0.0549	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
50	2.7400	2.7677	-0.0277	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
51	2.7900	2.7187	0.0713	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
52	2.8600	2.7881	0.0719	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
53	2.9100	2.8175	0.0925	I	+	+	+	+	I	+	X	+	+	+	I
				I	+	+	+	+	I	+	+	+	+	+	I

OBS Y-OBS Y-CAL RESIDUO -35 -25 -15 0 +15 +25 +35

FIGURA 8. ANÁLISIS RESIDUAL Y GRÁFICA DE ERRORES DE PRONÓSTICO DEL ENSAYO FINAL.

En la figura 8 se observó que el 96% de los datos cayeron dentro de las ± 2 desviaciones estándar, indicando ésto que gracias al entrenamiento obtenido en el ensayo preliminar se mejoró el manejo experimental tanto de los animales como del experimento mismo. En dicha figura se presentan las Y-calculadas que son equivalentes a la concentración de nitrógeno del carcass calculado (%N carcass calculado). Estas diferencias o residuos son, como ya se había mencionado anteriormente, los que de alguna forma contienen la historia que nos permite diagnosticar la bondad del modelo. La gráfica de errores de pronóstico del ensayo final (figura 8) dado en términos de error experimental, errores originados de nuestra impotencia de medir exactamente variables físicas, inherentes al experimento, muestran que el 96% de las mediciones caen dentro de ± 2 desviaciones estándar promedio, lo que significa que los errores sí están siguiendo una distribución normal, lo cual refleja un buen manejo experimental en todos los aspectos. Si existiera una variabilidad muy alta, esto es, que no cayeran dentro de ± 2 desviaciones estándar, significaría que no existe control sobre el proceso. Si pudiéramos realizar una cantidad muy grande de observaciones podríamos reunir todas las concentraciones de nitrógeno de carcass calculados (%N carcass calculado) medidos en una superficie, esta superficie recibe el nombre de superficie de respuesta y es, ni más ni menos, que el conjunto de todas las posibilidades del fenómeno dentro de los rangos de factores experimentados. Conociendo la superficie de respuesta conoceríamos prácticamente todo lo referente a nuestro fenómeno. Sin embargo, la importancia de lo anterior se vería disminuida si para conocer un contorno de respuesta tuvieramos que hacer una infinidad de experimentos. Es precisamente el objetivo del Diseño Estadístico de Experimentos hacer esto con un número limitado y mínimo de experimentos, donde en 2 dimensiones se muestre lo esencial de la superficie de respuesta. Nuestra representación ha ganado en claridad, precisión y sencillez. Los contornos de respuesta son representaciones bidimensionales de la superficie de respuesta. Es pues una sección de la superficie de respuesta original (Fabila, 1998). El contorno de respuesta correspondiente al modelo final se muestra en la figura 9.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

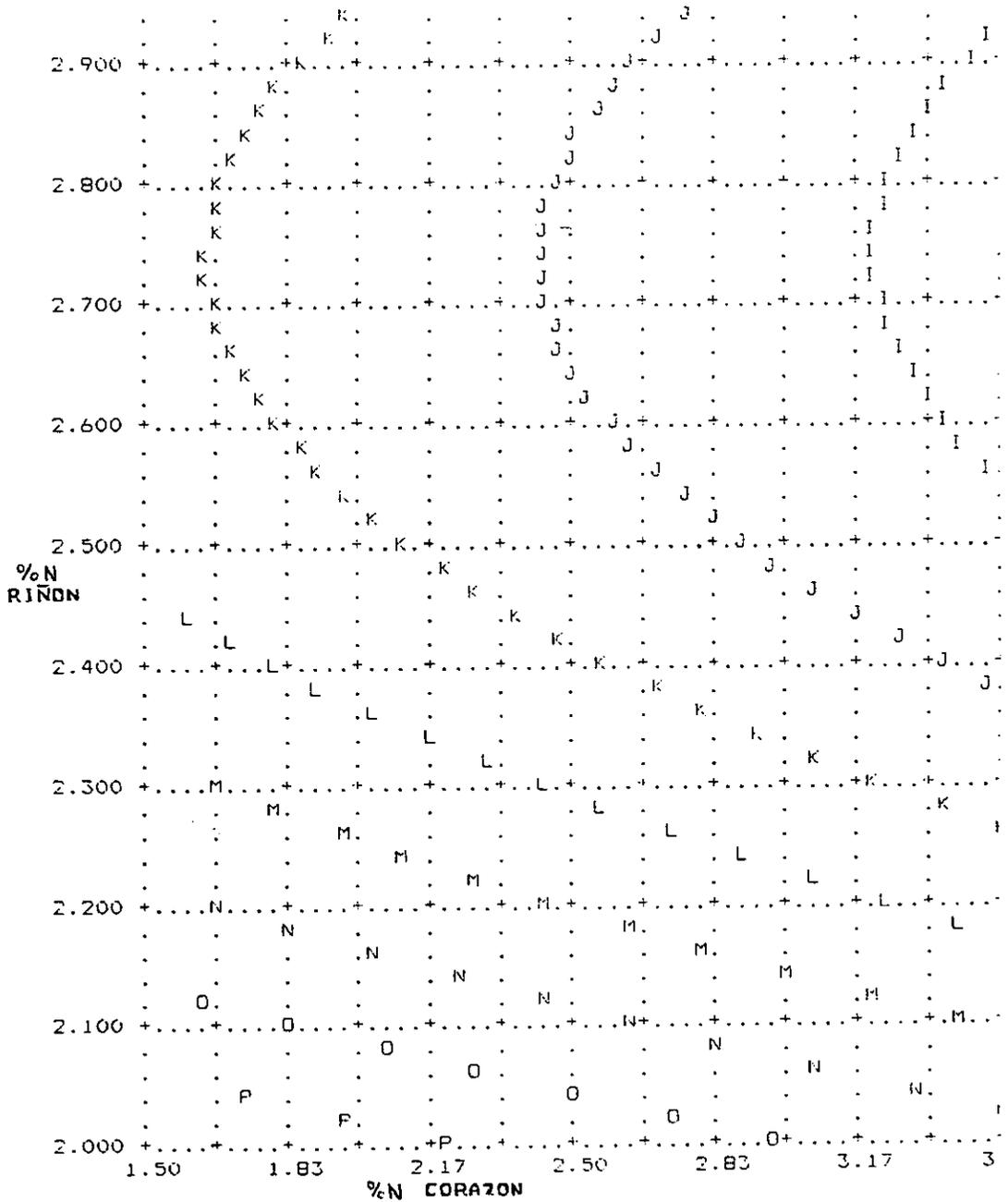


FIGURA 9. CONTORNO DE RESPUESTA DEL MODELO PREDICTOR FINAL.

A partir de dicho contorno de respuesta podemos obtener gráficamente un resultado similar al que se obtendría a partir de la ecuación del ensayo final para calcular la concentración de nitrógeno en el carcass calculado ($\%N \text{ carcass caculado} = 9.0565 - 0.1010C - 4.4868R + 0.8254R^2$). Si consideramos en la figura 9 cierta concentración de nitrógeno del corazón, representado en el eje de las abscisas como $\%N \text{ corazón}$ y cierta concentración de nitrógeno de los riñones, representado en el eje de las ordenadas como $\%N \text{ riñones}$, podremos obtener en su intersección cierta concentración de nitrógeno de carcass calculado. Por ejemplo, si en cierto experimento se determina una concentración de nitrógeno en el corazón de un animal de experimentación de alguna dieta en particular de 3.17% y una concentración de nitrógeno en los riñones de 2.3%, tendremos que interpolar dichos valores localizándolos en ambos ejes hasta su intersección, donde encontraremos una letra determinada, denominada letra clave, en el ejemplo corresponde a la letra K, una vez conocida la letra clave se hace uso de la tabla auxiliar que es la tabla 29, entonces localizamos en dicha tabla la letra clave para así obtener el $\%N \text{ carcass calculado}$ correspondiente, que en este caso es de 2.789%.

TABLA 29. CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN CARCASS CALCULADO A PARTIR DE LETRA CLAVE.

LETRA CLAVE	%N carcass calculado	LETRA CLAVE	%N carcass calculado	LETRA CLAVE	%N carcass calculado
A	2.000	H	2.553	O	3.105
B	2.079	I	2.632	P	3.184
C	2.150	J	2.711	Q	3.263
D	2.237	K	2.789	R	3.342
E	2.316	L	2.868	S	3.421
F	2.395	M	2.947	T	3.500
G	2.474	N	3.026		

Sin embargo, debe quedar muy claro que el contorno de respuesta y, por lo tanto, la tabla 29, son sólo una herramienta de apoyo que no se puede emplear para calcular el %N carcass calculado de manera confiable y/o exacta, pues habrán valores que no intersecten puntualmente con una letra clave. Cabe mencionar que la figura 9 representa sólo una parte de la superficie total de respuesta del Modelo Final, aunque en la tabla 29 se incluyan letras claves más de las necesarias (letras que van desde la A hasta la T).

UTILIZACIÓN NETA DE LA PROTEÍNA (NPU) MODIFICADO

En la tabla 30 se muestra el promedio de los valores de % nitrógeno de carcass calculado, a partir de las concentraciones de nitrógeno del corazón y riñones, mediante el uso de la ecuación del modelo final (%N carcass calculado = $9.0565 - 0.1010C - 4.4868R + 0.8254R^2$), correspondiente a cada dieta.

**TABLA 30. CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO (%) EN CARCASS CALCULADO
ENSAYO FINAL.**

DIETA	% N EN CARCASS CALCULADO ¹
HUEVO	2.7877
LECHE	3.0343
CASEINA	2.7592
SOYA	2.7406
GARBANZO	2.8466
TRIGO	2.7869
AJONJOLI	2.7357
LENTEJA	2.7855
GELATINA	2.7909
DLN	2.7803

1) Calculada mediante la ecuación:

$$\%N \text{ carcass calculado} = 9.0565 - 0.1010 C - 4.4868 R + 0.8254 R^2$$

Estas concentraciones de nitrógeno en el carcass calculado se sometieron a un análisis de varianza, el cual reveló que si hay diferencia significativa en las concentraciones de nitrógeno en el carcass calculado entre los grupos. Con el %N en el carcass calculado (tabla 30) y otros datos contenidos en la tabla 31 (peso final y alimento ingerido) se calcularon el nitrógeno ingerido y nitrógeno corporal del carcass calculado (Ncc), necesarios para calcular el NPU modificado a partir de la concentración de nitrógeno en el carcass calculado, empleándose las siguientes fórmulas (ver metodología: Utilización Neta de la Proteína (NPU) original):

$$\text{NPU modificado} = [(\text{Ncc}_p - \text{Nc}_{\text{DLN}}) / \text{N ingerido}_p] \times 100$$

$$\text{Ncc} = \text{N corporal calculado} = (\text{Peso final} \times \% \text{N en carcass calculado}) / 100$$

$$\text{N ingerido} = \text{Nitrógeno ingerido}$$

$$= (\text{Alimento ingerido} \times \text{Proteína de dieta}) / (\text{Factor} \times 100)$$

TABLA 31. DATOS NECESARIOS PARA CALCULAR EL PNU MODIFICADO DEL ENSAYO FINAL ¹.

	PESO FINAL (g)	ALIMENTO INGERIDO (g)	NITROGENO INGERIDO (%)	NITROGENO CORPORAL CALCULADO Ncc (%)
HUEVO	137.78	147.94	2.3956	3.8403
LECHE	108.56	104.06	1.7480	3.2875
CASEINA	108.83	105.48	1.8841	3.0029
SOYA	84.96	103.64	1.6701	2.3269
GARBANZO	20.38	88.24	1.5381	2.5808
TRIGO	12.83	85.99	1.2852	1.9034
AJONJOLI	10.26	74.42	1.2652	1.7271
LENTEJA	2.88	55.16	0.9410	1.4236
GELATINA	-1.95	35.73	0.5784	1.0001

1) Valores promedio.

El NPU modificado del ensayo final se muestra en la tabla 32, junto con el NPU reportado en la bibliografía (F.A.O., 1970), ambas se correlacionan de manera significativa ($r=0.96482103$).

**TABLA 32. UTILIZACIÓN NETA PROTEÍNIC (NPU) MODIFICADO
ENSAYO FINAL.**

DIETA	NPU modificado	NPU reportado
HUEVO	88.8	93.5
LECHE	87.7	81.6
CASEINA	71.2	72.1
SOYA	50.4	61.4
GARBANZO	51.0	52.0
TRIGO	52.2	40.3
AJONJOLI	44.7	46.2
LENTEJA	27.6	29.7
GELATINA	13.8	2.5

- 1) La correlación entre el NPU reportado y el NPU modificado mostró un buen coeficiente de correlación ($r=0.96482103$), con un nivel de significancia $p < 0.005$ (F.A.O., 1970).

UTILIZACIÓN NETA DE LA PROTEÍNA (NPU) ORIGINAL Y MODIFICADO

Debemos considerar que un valor alto de NPU (ya sea original o modificado) implica un mayor contenido de nitrógeno retenido en el carcass o en los diferentes tejidos u órganos a partir del nitrógeno ingerido, resultando entonces que este índice biológico tenderá a aumentar conforme se incremente la calidad de la proteína.

Si consideramos que tanto el NPU original como el NPU modificado se correlacionan de manera significativa con el NPU reportado en la bibliografía, entonces la correlación entre el NPU original y NPU modificado también es significativa ($r= 0.97890384$), esto lo podemos ver en la tabla 33. Debemos considerar que pruebas de balance de nitrógeno, como lo es el NPU, están afectadas por muchos factores tales como el nivel de proteína, el desbalance de aminoácidos, la ingesta calórica, hormonal y la estación del año. La mayoría de estas variables se consideraron en el ensayo.

TABLA 33. UTILIZACIÓN NETA DE LA PROTEÍNA ORIGINAL Y MODIFICADO ¹.

DIETA	NPU original	NPU modificado
HUEVO	91.6	88.8
LECHE	78.0	87.7
CASEINA	72.6	71.2
SOYA	56.4	50.4
GARBANZO	54.6	51.0
TRIGO	48.5	52.2
AJONJOLI	41.8	44.7
LENTEJA	30.7	27.6
GELATINA	7.8	13.8

1) La correlación entre el NPU original y NPU modificado mostró un buen coeficiente de correlación ($r=0.97890384$), con un nivel de significancia $p < 0.005$.

Realizando el análisis de varianza del NPU original encontramos que existe diferencia significativa entre la media de los valores de NPU original correspondiente a cada una de las dietas en estudio (tabla 34), esto nos indicó que este índice biológico sí logró discriminar significativamente las diferentes fuentes de proteína en función de su calidad nutritiva.

TABLA 34. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL NPU ORIGINAL.

Análisis de varianza de un factor					
Datos: NPU original					
Nivel de confianza: 95				Prueba: LSD	
Origen de variación	Suma de cuadr.	d.f.	Prom. cuadrados	F	Nivel de sig.
Entre grupos	56840.244	8	7105.0305	35.633	0.0000
Dentro de grupos	16948.544	85	199.3946		
Total	73788.788	93			

Una vez determinada la existencia de diferencia entre los valores medios del NPU original, se evaluó cuales eran diferentes entre sí, aplicando la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher (DMS o LSD) (tabla 35). La manera gráfica de apreciar esta discriminación se observa en la figura 10.

TABLA 35. ANÁLISIS DE RANGO MÚLTIPLE DEL NPU ORIGINAL.

Método: 95 % LSD				
Nivel	Dieta	Número	Promedio	Grupos homogéneos
9	Gelatina	12	7.793644	X
8	Lenteja	10	30.712120	X
7	Ajonjolí	10	41.822849	X X
6	Trigo	10	48.480180	X X
5	Garbanzo	10	54.576103	X
4	Aislado de soya	10	56.381588	X
3	Caseína	12	72.606242	X
2	Leche	10	77.976259	X
1	Huevo	10	91.607825	X

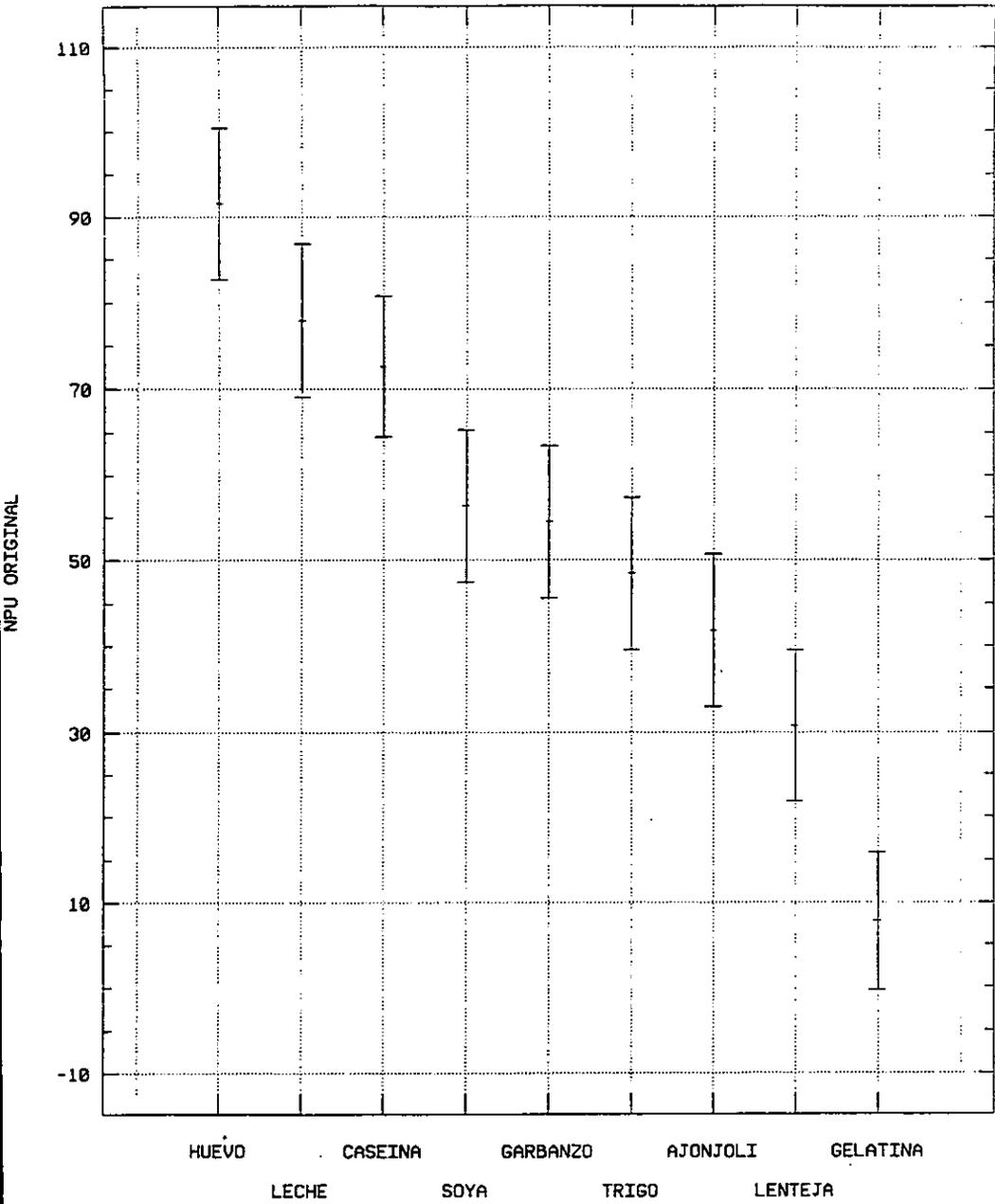


FIGURA 10. PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL NPU ORIGINAL.

De acuerdo al análisis de rango múltiple, empleando el método LSD, podemos constatar que, para el caso de valores de NPU original, el huevo es la proteína de mejor calidad nutritiva, diferenciándose de las demás fuentes de proteína de manera significativa, en tanto que la leche señaló una calidad nutritiva significativamente menor con respecto a la del huevo, más no con respecto a la caseína. La soya, el garbanzo y el trigo no se diferenciaron entre sí de manera significativa, pero mostraron una calidad nutritiva significativamente menor con respecto a la leche y caseína y mucho menor con respecto a la del huevo. La pasta residual de ajonjolí mostró una calidad nutritiva significativamente menor con respecto al garbanzo, soya, caseína, leche y huevo, mas no con respecto al trigo, en tanto que la lenteja mostró una calidad nutritiva significativamente menor con respecto al trigo, garbanzo, soya, caseína, leche y huevo mas no con respecto al ajonjolí. Finalmente, la gelatina indicó una calidad nutritiva significativamente menor con respecto al resto de las fuentes de proteína, con un nivel de significancia del 5%.

TABLA 36. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL NPU MODIFICADO.

Análisis de varianza de un factor					
Datos: NPU modificado					
Nivel de confianza: 95					Prueba: LSD
Origen de variación	Suma de cuadr.	d.f.	Prom. Cuadr.	F	Nivel de sig.
Entre grupos	47332.287	8	5916.5359	42.276	0.0000
Dentro de grupos	10916.245	78	139.9519		
Total	558248.533	86			

Por otro lado, también se realizó el análisis de varianza del NPU modificado y encontramos que también existió diferencia significativa entre la media de los valores de NPU modificado correspondiente a cada una de las dietas en estudio (tabla 36), por lo que podemos afirmar que nuestro índice modificado también logró discriminar significativamente las diferentes fuentes de proteína en función

de su calidad nutritiva (ver figura 11). También se aplicó la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher (DMS o LSD) (tabla 37).

TABLA 37. ANÁLISIS DE RANGO MÚLTIPLE DEL NPU MODIFICADO.

Método: 95 % LSD				
Nivel	Dieta	Número	Promedio	Grupos homogéneos
9	Gelatina	8	13.768958	X
8	Lenteja	10	27.616090	X
7	Ajonjolí	10	44.709630	X
4	Aislado de soya	10	50.3722377	X
5	Garbanzo	10	51.000719	X
6	Trigo	9	53.016561	X
3	Caseína	10	71.217714	X
2	Leche	10	87.674387	X
1	Huevo	10	88.855620	X

Según el análisis de rango múltiple empleando el método LSD, podemos afirmar que en el caso del NPU modificado, el huevo y la leche fueron las fuentes de proteína que mostraron la mejor calidad nutritiva y no se diferenciaron entre sí de manera significativa; en tanto que la caseína mostró una calidad nutritiva significativamente menor con respecto a la del huevo y la leche. La soya, el garbanzo, el trigo y el ajonjolí no se diferenciaron entre sí de manera significativa, pero mostraron una calidad nutritiva significativamente menor con respecto al huevo, leche y caseína pero significativamente mayor con respecto a la lenteja y gelatina. La lenteja mostró una calidad nutritiva significativamente menor con respecto al ajonjolí, trigo, garbanzo, soya, caseína, leche y huevo. Finalmente, la gelatina indicó una calidad nutritiva significativamente menor con respecto al resto de las fuentes de proteína, con un nivel de significancia del 5%.

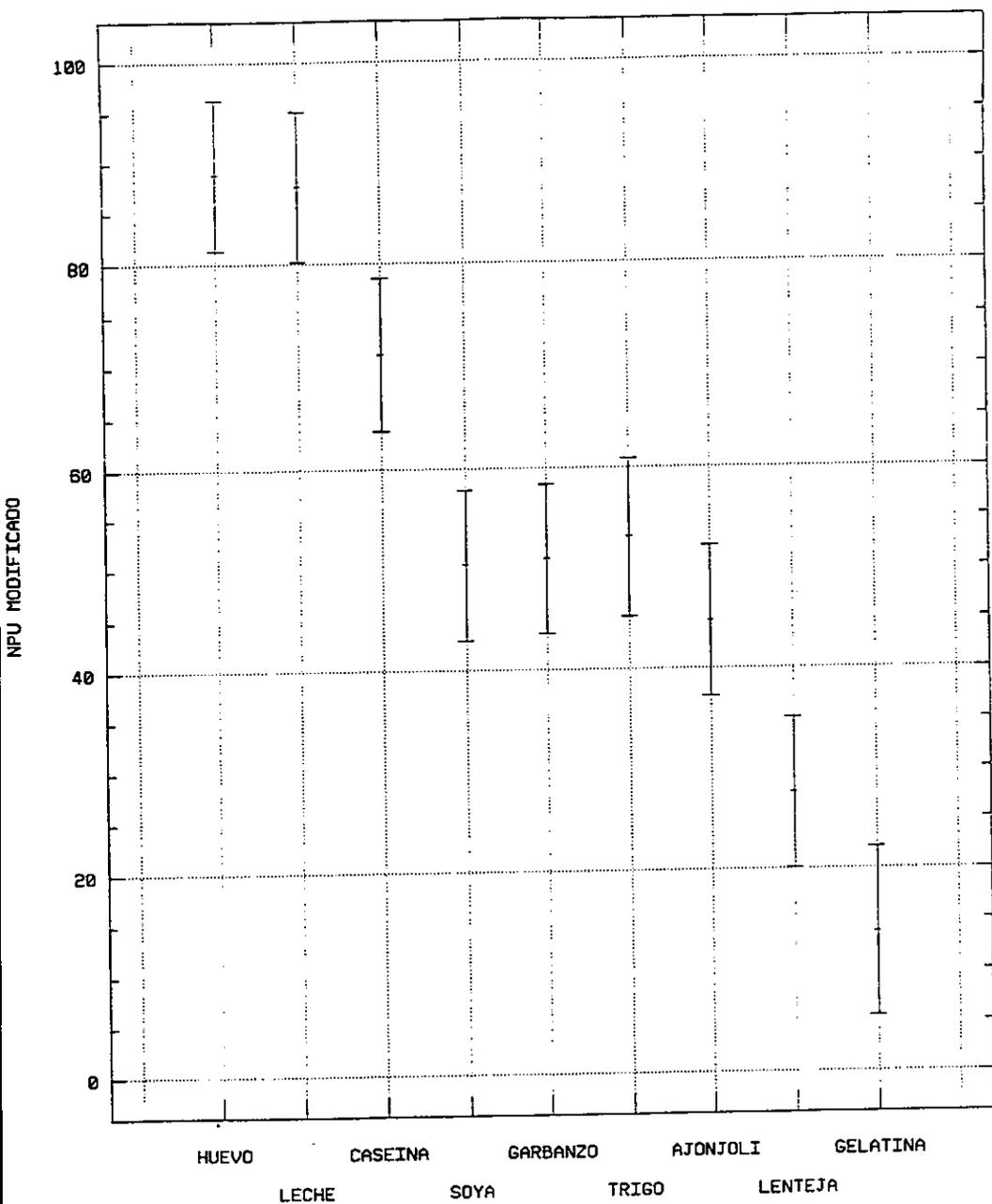


FIGURA 11. PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL NPU MODIFICADO.

Una forma gráfica de señalar las diferencias anteriores, tanto del NPU original como del modificado es la siguiente:

TABLA 38. DISCRIMINACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS DIETAS.

	DIETA								
	Huevo	Leche	Caseína	Soya	Garban.	Trigo	Ajonjolí	Lentej.	Gelatina
NPU									
original	91.6	78.0	72.6	56.4	54.6	48.5	41.8	30.7	7.8
NPU									
modif.	88.8	87.7	71.2	50.4	51.0	52.2	44.7	27.6	13.8

Distinta línea indica diferencia significativa ($p < 0.05$), en forma horizontal.

Por último se realizó la correlación del NPU modificado con los demás índices, tanto biológicos como químicos que se calcularon con los datos del ensayo final (tablas 22, 23 y 24), teniendo lo siguiente: el NPU se correlacionó de manera significativa con los índices biológicos PER y NPR ($r = 0.95612037$ y $r = 0.94920751$, respectivamente), con un nivel de significancia de $p < 0.005$. Esta correlación nos indicó que los ensayos biológicos son métodos con los que podemos obtener una adecuada discriminación estadística entre los resultados obtenidos para evaluar la calidad de una proteína. Ensayos biológicos basados tanto la ganancia en peso como la retención de nitrógeno, mostraron tener una buena correlación, por lo que a su vez podría correlacionarse con la calidad y la cantidad de la ingesta de proteína (Monchi and Rerat, 1993).

En NPU modificado también se correlacionó de manera significativa con los índices químicos S.Q. e I.A.A.E. ($r = 0.8634148$ y $r = 0.7957044$, respectivamente) con un nivel de significancia $p < 0.005$. Claro que debemos recalcar que los índices químicos no consideran la digestibilidad de las proteínas pues existen una gran diferencia entre la cantidad total de aminoácidos y los aminoácidos disponibles en una proteína. Del total de los aminoácido presentes en una proteína, sólo parte son disponibles y, por lo tanto, capaz de ser absorbidos, cuando existe algún

aminoácido limitante o existe algún factor que impida su disponibilidad total. Todo esto ocasiona un sesgo al comparar los métodos químicos con los métodos de balance de nitrógeno, los cuales si consideran tanto la digestibilidad como la concentración de cada uno de los aminoácidos indispensables y su adecuación al organismo animal. Los índices químicos pueden sobreestimar la calidad de una proteína.

C O N C L U S I O N E S

La caracterización completa de cada una de las fuentes de proteína (análisis proximal, contenido de aminoácidos y el contenido calórico), incluyendo los índices químicos (calificación química (S.Q.) e índice de aminoácidos indispensables (I.A.A.E.) y los índices biológicos de crecimiento corporal (PER, NPR y PNU), concordaron con los reportados en la bibliografía.

Se determinó en el ensayo preliminar que los tejidos que mejor predicen la concentración de nitrógeno en el carcass son: el corazón y los riñones, descartando el uso de los siguientes tejidos: patas delanteras, bazo, intestino e hígado; mediante una regresión multivariable por etapas empleando un modelo cuadrático completo.

Se desarrolló el diseño experimental del ensayo biológico de la Utilización Neta de la Proteína (NPU) modificado y se realizó su evaluación estadística encontrándose el Modelo Predictor para determinar la concentración de nitrógeno en el carcass calculado a partir de las modificaciones propuestas, es decir, de la concentración de nitrógeno en el riñón y el corazón:

$$\%N \text{ carcass calculado} = 9.0565 - 0.1010 C - 4.4868 R + 0.8254 R^2$$

Donde:

%N carcass calculado = concentración de nitrógeno en el carcass calculado.

R = concentración de nitrógeno en los riñones, en %.

C = concentración de nitrógeno en el corazón, en %.

Mediante el modelo anterior se realizó el cálculo del NPU modificado que mostró una adecuada correlación con el NPU original ($r = 0.97890384$), con un nivel de significancia de $p < 0.005$, observada en un amplio rango de calidad de proteína, que va desde el huevo como proteína de mejor calidad hasta la gelatina de menor calidad, pasando por la leche, caseína, soya, garbanzo, trigo, pasta residual de ajonjolí, trigo y lenteja.

Se determinó la existencia de diferencia significativa entre la media de los valores correspondiente a cada una de las dietas en estudio, tanto del NPU original como del NPU modificado, mediante el análisis de varianza correspondiente, logrando discriminar las diferentes fuentes de proteína en función de su calidad nutritiva. Además, de acuerdo a la prueba de rango múltiple se observó que el NPU modificado discriminó, en términos generales, de forma similar al NPU original.

El NPU modificado se correlacionó de manera significativa con el índice biológico de Relación de Eficiencia de la Proteína (PER) ($r = 0.95612037$) y con el de la Relación Neta de la Proteína (NPR) ($r = 0.94920751$), con un nivel de significancia de $p \leq 0.005$.

El NPU modificado se correlacionó de una manera adecuada con los índices químicos de predicción biológica: Calificación Química (S.Q.) ($r = 0.8634148$) e Índice de Aminoácidos Indispensables (I.A.A.E.) ($r = 0.7957044$).

B I B L I O G R A F Í A

- Altschul, A. M. Processed plant protein foodstuffs. Academic press, 1-39, 83-122, 153-185, 399-415, 535-555, 717-723. New York (1958).
- Aragón, E. y Lucas, B. Manual de prácticas de laboratorio de nutrición. Facultad de Química. División de Ingeniería Departamento de Alimentos y Biotecnología. pp. 7-11, 33-41. México, D.F. (1991).
- Bender, A.E. and Doell, B.H. Biological evaluation of proteins: a new aspect. Brit. J. Nutr. 11, 140-158 (1957).
- Biological assay methods for protein evaluation. National Academy of Sciences. Publication. 1100, 23-37. Washington, D.C. (1963).
- Block, R. J. and Bolling, D. The amino acid composition of proteins and foods. Thomas, Springfield, Illinois (1951).
- Block, R.J. and Mitchell, H.H. The correlation of the amino acid composition of protein with their nutritive value. Nut. Abst. and Revs. 16, 249 (1946).
- Bourgeois, C.M. y Le Roux, P. Proteínas animales. Técnica y documentación. pp. 1-31, 143-159, 169-177, 190-229. Paris (1982).
- Campbell, J. A. Methodology of protein evaluation. A critical appraisal of methods for evaluation of protein in foods originally issued as nutrition. In: The PAG Compendium. Document R101 add. (WHO/FAO/UNICEF). Vol. D6, 49-94. N.Y. (1961).
- Corbin, J. Laboratory nutrition. In: Handbook of Laboratory Animal Science. Melby, E.C. and Altman N.M. (Ed.). CRC Press, Inc. 1-3, Cleveland (1976).
- Chapman, D.G., et al. Evaluation of protein in foods. A method for the determination of protein efficiency ratios. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 679. (1959).
- Charley, H. Preparación de alimentos. Ediciones Orientación, S.A. de C.V. Editorial Limusa. Vol. 2, 382-383. México, D.F. (1990).

- Chatterjee, S. and Price, B. Regression analysis by example. John Wiley. 125-128, 131, 133-134, 136-137. N.Y. (1977).
- De Maeyer, E.M. Collaborative study on protein evaluation. In: The PAG Compendium. Sach, M.Y. (Ed.). John Wiley & Sons, Vol. D, 729-732. N.Y. (1975).
- Delgado N.L. y Revuelta M.E. Guía práctica para el manejo de animales de laboratorio. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. pp. 88-89. México, D.F. (1993).
- Draper, N.R. and Smith, H. Applied regression analysis. John Wiley. Cap. 3. N.Y. (1966).
- FAO. Estudios sobre nutrición. Contenido de aminoácidos de los alimentos y datos biológicos de las proteínas. Servicio de Ciencia y Política de Alimentación. Dirección de alimentación. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 24, 1-17, 13-18. Roma (1970).
- FAO/WHO. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO: Expert. Committee. Wld. HHg. Org. Techn. Rep. Ser. 522 (1973).
- Fabila, C.G. Diseño y análisis de experimentos industriales. Departamento de Ingenierías, Universidad Iberoamericana. pp. 2-4, 101-110, 137-152. México, D.F. (1998).
- Fox, B.A. y Cameron, A. G. Ciencia de los alimentos, nutrición y salud. Limusa, pp 179-206. México, D.F. (1992).
- Goena, M., et al. Muscle and liver protein synthesis and degradation in growing rats fed a raw field bean diet. Rev. Esp. Fis. 44 (4) 345-352 (1988).
- Helrich, K (Editor). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition, Published by A.O.A.C. Inc. Vol. I & II, 17-18, 40-62, 69-83, 1012, 1095-1098. Arlington (1990).
- Hurt, H.D. et. al. Factors which influence the biological evaluation of protein quality by the protein efficiency ratio method. In: Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Friedman, M. (Ed.), Vol. I, 87-112, Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1975).
- Iruegas, A.E. Determinación de la calidad proteínica de algunas leguminosas por diferentes métodos biológicos. Editado por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (I.N.C.A.), Guatemala, C.A. (1973).

- Kay D. E. Food legumes. The Tropical Products Institute. *Acribia*. 9, 65-67, 73-75, 79, 218-221, 225. London (1979).
- Lachance, P. A. and Miller, G. A. Protein quality assessment in the rat: correlation between whole carcass and hind limb nitrogen concentration. *Nutr. Rep. Int.* 7, 25-32 (1973).
- Mc Laughlan, J.M. and Kerth, M.O. Bioassays for protein quality In: Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Friedman, M. (Ed.). Marcel Dekker, Vol. 1, 79-112. N.Y. (1975).
- Macrae, R. (Editor). *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. University of Hull Hull, UK. R.K. Robinson University of Reading. 317-318, 718-789, 1362-1532, 2176-2839, 3066-3086, 3482-3484, 3792-3826, 4875-4878 (1993).
- Mauro, J. Effects of processing on proteins. In: Taylor and Geoffrey (Ed.). *Proceedings of the 13th Annual Congress on Nutrition*. London (1986).
- Mitchell, H.H. and Block, R.J. Some relationships between the amino acid contents of protein. *J. Biol. Chem.* 163, 599 (1946).
- Molinar, M.G. Valor energético de diversos alimentos determinados por medio de una bomba calorimétrica y métodos biológicos. Tesis. Escuela de Química. Universidad La Salle. México (1988).
- Monchi, M. and Rerat, A. Comparison of net protein utilization of milk protein mild enzymatic hydrolysates and free amino acid mixtures with close patters in the rat. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 17(9), 355-363 (1993).
- Muller, H.G. y Tobin, G. *Nutrición y ciencia de los alimentos*. *Acribia*. pp 47-108. Zaragoza (1992).
- Oser, B.L. In AA: Albanese (Ed.). *Protein and Amino acid nutrition*. Academic Press. 281-295. N.Y. (1959).
- Pedrero, D.L. y Pangborn, R.M. Evaluación sensorial de los alimentos. *Métodos analíticos*. Alhambra Mexicana. pp. 139-145. México, D.F. (1989).
- Pellett, P. and Young, V.R. Nutritional evaluation of protein foods. The United Nations University. Report of a working group sponsored by the International

Union of Nutritional sciences and the United Nations University Word Hunger Program. 1-16, 26-54, 103-110 (1973).

Robinson, S.D. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Acribia, pp. 122-137. Zaragoza (1991).

Sarwar, G. and Mc. Laughlan, J.M. Relative net protein ratio method for evaluating protein quality. *Nutr. Rep. Int.* 23 (6), 1157-1166 (1981).

Sotelo, A. and Lucas, B. Determination of Net Protein Utilization using whole carcass, hind leg or liver of the rat and its relationship with Protein Efficiency Ratio determination. *J. Nutr.* 108, 61-66 (1978).

Sotelo, A. and Lucas, B. A. Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis time on tryptophan determination of pure protein and of food. *Anal. Biochem.* 109, 192-197 (1980).

Sotelo, A. Leguminosas silvestres, reserva de proteína para la alimentación del futuro. *Rev. IC y T. México*, 3(54), 29-32 (1981).

Sotelo, A. and Lucas, B. Amino acid determination in pure proteins, foods, and feeds using two different acid hydrolysis methods. *Anal. Biochem.* 123, 349-356 (1982).

Takahashi, H., et. al. Protein and energy utilization in growing rats fed on the diets containing intact or partially hydrolyzed guar gum. *Biochem. Physiol.* 107 A(1) 255-260 (1994).

Yang, M.G. and Mickelsen, O. Laboratory animals in nutritional research. In: *Methods of Animal Experimentation*. Gay, W.I. (Ed.). Academic Press, N.Y. 1-7, 17-18, 33-36 (1974).

APÉNDICE II. ENSAYO BIOLÓGICO.

		TIEMPO DE EXPERIMENTACIÓN (DÍAS)																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
LOTE	FUENTE DE PROTEÍNA																					
1	HUEVO																					
2	LECHE																					
3	CASEINA																					
4	SOYA																					
5	GARBANZO																					
6	TRIGO																					
7	AJONJOLI																					
8	LENTEJA																					
9	GELATINA																					
10	DLN																					

Periodo de ingesta de la dieta correspondiente.

Periodo de adaptación inicial con su respectiva dieta (salvo la DLN, que es con caseína)

APÉNDICE III. REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA.

HOJA No. _____

Prueba biológica _____

RATA : _____	SEXO : _____	PESO INICIAL (P _i) : _____	DIETA : _____	FECHA : _____	
TIEMPO (Días)					TOTAL
PESO ANIMAL					P _f =
INCREMENTO ACUMULATIVO					P _f - P _i =
ALIMENTO INICIAL (A _i)					
ALIMENTO FINAL (A _f)					ΣAI =
ALIMENTO INGERIDO (AI = A _f - A _i)					
ALIMENTO ACUMULATIVO					
OBSERVACIONES:					

RATA : _____	SEXO : _____	PESO INICIAL (P _i) : _____	DIETA : _____	FECHA : _____	
TIEMPO (Días)					TOTAL
PESO ANIMAL					P _f =
INCREMENTO ACUMULATIVO					P _f - P _i =
ALIMENTO INICIAL (A _i)					
ALIMENTO FINAL (A _f)					ΣAI =
ALIMENTO INGERIDO (AI = A _f - A _i)					
ALIMENTO ACUMULATIVO					
OBSERVACIONES:					

RATA : _____	SEXO : _____	PESO INICIAL (P _i) : _____	DIETA : _____	FECHA : _____	
TIEMPO (Días)					TOTAL
PESO ANIMAL					P _f =
INCREMENTO ACUMULATIVO					P _f - P _i =
ALIMENTO INICIAL (A _i)					
ALIMENTO FINAL (A _f)					ΣAI =
ALIMENTO INGERIDO (AI = A _f - A _i)					
ALIMENTO ACUMULATIVO					
OBSERVACIONES:					