



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION NUTRITIVA DE DIFERENTES
PREPARADOS PROTEINICOS DE LA ALMENDRA DE
CALABAZA (*Cucurbita pepo*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ITZEL ALVAREZ UGALDE

29438

MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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. Angela Sotelo López

Vocal Prof. Bernardo Lucas Florentino

Secretario Prof. Lucía Cornejo Barrera

1 er. Suplente Prof. Leticia Gil Vieyra

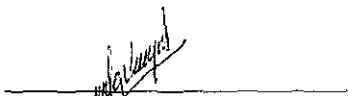
2 do. Suplente Prof. Rosa Maria Argote Espinosa

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto "E",
Facultad de Química, UNAM.

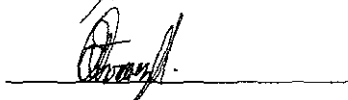
Asesor: M. en C. Bernardo Lucas Florentino



Supervisor técnico: Q.F.B. Leticia Gil Vieyra



Sustentante: Itzel Alvarez Ugalde



AGRADECIMIENTOS

A mi maestro por su compromiso, confianza y oportunas observaciones.

Gracias Profesor Bernardo.

A Lety Gil por sus conocimientos e incondicional ayuda y compañía.

Gracias Lety

A Rosita Argote por su ayuda, y su siempre gentil trato.

A Lucy por sus tan atinados consejos y brindarme su confianza.

A la Profesora Angela Sotelo por sus comentarios y observaciones

Al Méd. Vet. Atonatui E. Gómez y a la M. en C. Adriana Ruiz por su asesoría y desinteresada colaboración.

A la Sra Vicy por el don de escuchar y siempre ayudar a quien lo pide.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

En lugar muy especial al ser que me ha dado todo lo mejor de sí; a mi madre, por su confianza, motivación y apoyo total e incondicional para terminar mi carrera; así como todo lo que hago.

Gracias mamá

A mi tía Tere por también ser mi madre y apoyarme en todo lo que necesito.

A mi tío Andrés por su motivación, aún en la distancia.

A Julito por ser el hombre que amo y estar junto a mí.

A cada uno de mis compañeros y profesores con los que conviví durante la carrera.

A la UNAM, institución a la que orgullosamente pertenezco.

Y a ese poder superior que nos permite estar aquí.

INDICE

	Pagina
1. RESUMEN	1
2. OBJETIVOS	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Problemática y propuestas	3
3.2 Descripción del género <i>Cucurbita</i>	7
3.3 Composición química de la semilla de calabaza	8
3.4 Proteínas	10
3.4.1 Aminoácidos	11
3.4.2 Requerimientos proteínicos	12
3.4.3 Evaluación de la calidad de las proteínas	14
3.4.4 Digestibilidad proteínica	17
3.5 Parámetros hematológicos	19
3.6 Fuentes proteínicas	21
3.7 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas	23
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	27
4.1 Semilla	28
4.2 Descascarado	28
4.3 Parámetros físicos	28
4.4 Análisis proximal	29
4.5 Desengrasado	36
4.6 Proteína verdadera	36

4.7	Purificación de la fracción proteínica	38
4.8	Digestibilidad "in vitro"	40
4.9	Perfil de aminoácidos	42
4.9.1	Determinación de triptofano	47
4.10	Bioensayo nutricional	49
4.10.1	Digestibilidad "in vivo"	51
4.11	Propiedades fisicoquímicas	53
4.11.1	Humectabilidad	53
4.11.2	Capacidad de retención de agua (CRA)	55
4.11.3	Determinación de pH	57
4.11.4	Volumen de sedimentación	57
4.11.5	Viscosidad	58
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
6	CONCLUSIONES	84
7.	BIBLIOGRAFIA	86

1. RESUMEN

La semilla de calabaza, del género ***Cucurbita pepo***, se consume ocasionalmente en ciertas regiones de México. Sin embargo, es una fuente subaprovechada de proteína y de grasa. El presente trabajo tiene la finalidad de evaluar nutricionalmente los diferentes preparados proteínicos de la almendra de calabaza ***Cucurbita pepo***; específicamente la consumida en el municipio de Aquismón, S.L.P., con el fin de proponer una fuente alternativa en la alimentación animal y humana. Dicha evaluación, se llevó a cabo mediante el ensayo biológico de Relación de Eficiencia Proteínica (PER) y se complementó de acuerdo al perfil de aminoácidos, y calificación química. Se encontró que los aminoácidos limitantes son la isoleucina y los azufrados; y que el aislado proteínico presenta el mayor valor de PER (2.10) ; mientras que el concentrado presenta el más bajo (1.19); lo cual es confirmado por los resultados obtenidos en las pruebas de digestibilidad "in vivo", que son de 94.14% y 89.75%, para aislado y concentrado ; respectivamente. Además se evaluaron algunas propiedades fisicoquímicas; encontrándose que presentan características similares a los preparados de soya, lo cual indica que con un estudio más profundo de estas propiedades, es posible el uso potencial de preparados proteínicos de ***Cucurbita pepo***; en alimentos elaborados.

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar nutricionalmente diferentes preparados proteínicos de la almendra de calabaza (***Cucurbita pepo***) con la finalidad de su utilización en la alimentación animal y humana.

Objetivos particulares

- Confirmar el alto contenido de proteína en la almendra de calabaza
- Obtener diferentes preparados en los cuales se concentre y purifique la fracción proteínica de la almendra de calabaza; caracterizándolos bromatológicamente
- Determinar la digestibilidad "in vitro " e "in vivo" de cada uno de los preparados
- Determinar la composición de aminoácidos en la almendra y en los preparados
- Realizar las complementaciones necesarias de acuerdo al perfil de aminoácidos y la calificación química, en los preparados de la almendra de calabaza.
- Evaluar la calidad nutritiva de la proteína en los diferentes preparados proteínicos; mediante un ensayo biológico
- Evaluar algunas propiedades fisicoquímicas en los preparados proteínicos

3. ANTECEDENTES

3.1 Problemática y propuestas

México es un país rico en recursos naturales y en diversidad, con los climas más variados y dueño de un litoral extenso; por lo cual su capacidad para producir los más variados alimentos es enorme; no obstante, apenas se utilizan algunos de ellos debido a varias razones; en primer lugar se debe garantizar la inocuidad y su grado de aceptación de quien los consume; muchas especies, aunque contienen nutrimentos, contienen también sustancias que resultan ser tóxicas o desagradables para los sentidos. Otras especies son escasas o su disponibilidad es impredecible. La tendencia ha sido concentrarse en un menor número de alimentos produciendo cantidades mayores de cada uno de ellos. Este fenómeno es el resultado de una prolongada selección de los alimentos más eficientes, inocuos y agradables; y en la medida en que se exige mayor eficiencia se extrema más la selección, hasta un punto en el que la dieta se vuelve monótona e incompleta. Aunado a esta selección, existe el problema económico de la mayoría de la población y en especial la de los grupos marginados y de comunidades rurales; ya que es común en ellos una alimentación inadecuada, y en consecuencia una nutrición poco satisfactoria.

De manera general, los patrones de dieta de estas poblaciones ocasionan deficiencias nutrimentales, particularmente de energía y proteínas. Cuando la dieta es crónicamente insuficiente en uno o más nutrimentos se establece un balance negativo que es incompatible con la salud. La desnutrición afecta la fisiología entera, disminuyen las defensas y se eleva la morbilidad por enfermedades infecciosas; éstas producen mayor desnutrición, y de este círculo se deriva mayor mortalidad. En México, en el año de 1998; la desnutrición ocupó el décimo lugar dentro de las veinte principales causas de mortalidad general. (TABLA No. 1) Además es conocido que dentro de los

miembros de una comunidad, los niños son especialmente vulnerables; en la **TABLA No. 2** se observan los datos de un estudio realizado en 1999, sobre el estado nutricional en menores de cinco años según el nivel de marginación existente en el país.

TABLA No.1
PRINCIPALES CAUSAS DE DEFUNCIÓN EN MÉXICO^a

Orden de importancia	Causas	Defunciones ^b
1	Enfermedades de corazón	68 677
2	Tumores malignos	52 670
3	Diabetes mellitus	41 832
4	Accidentes	35 517
5	Enfermedades crónicas del hígado	27 211
6	Enfermedades cerebrovasculares	25 050
7	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	19 879
8	Influenza y Neumonía	15 026
9	Agresiones	13 656
10	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	10 492
11	Enfermedades pulmonares	10 354
12	Malformaciones congénitas	10 120
13	Insuficiencia renal	7 944
14	Enfermedades infecciosas intestinales	6 668
15	Bronquitis crónica	5 005
16	VIH	4 100
17	Anemias	3 890
18	Tuberculosis Pulmonar	3 573
19	Suicidio	3 573
20	Septicemia	3 183

^aFuente: INEGI. Dirección General de Estadística. Dirección de Estadísticas Demográficas y Sociales

^bPresentadas en el año de 1998

TABLA No. 2
ESTADO NUTRICIONAL EN MENORES DE CINCO AÑOS SEGÚN NIVEL DE
MARGINACIÓN EN MÉXICO

Nivel de marginación	Total	Grado de Desnutrición		
		Leve	Moderado	Severo
Muy alto				
Chiapas	140 476	108 278	29 536	2 662
Hidalgo	66 035	52 330	12 401	1 304
Oaxaca	114 204	83 301	27 741	3 162
Puebla	119 523	87 604	28 396	3 523
Veracruz	136 442	108 362	25 711	2 369
Alto				
Campeche	19 986	15 129	4 304	433
Durango	16 684	14 350	2 307	207
Michoacán	25 799	21 805	3 681	313
San Luis Potosí	93 309	77 964	18 769	1 576
Yucatán	81 341	59 975	19 289	2 077
Zacatecas	12 964	11 597	1 317	50
Medio				
Nayarit	9 646	8 185	1 337	124
Sinaloa	9 114	8 436	650	28
Bajo				
Coahuila	8 608	7 538	973	97
Chihuahua	14 503	11 869	2 315	319
Tamaulipas	3 584	3 089	432	63
Muy bajo				
Baja California Sur	665	548	106	11
Valle de México	4	3	1	0

Fuente: IMSS. Coordinación General del Programa IMSS-Solidaridad

Es una tendencia clara que la desnutrición presenta una distribución geográfica característica, encontrándose la mayoría de los casos al sur y sureste del país, y con menor incidencia en el norte y centro de la República. La predominancia rural de los problemas nutricios es un hallazgo común en casi todos los países en desarrollo ya que a pesar de que las áreas rurales producen los alimentos, su situación económica y social favorece un consumo insuficiente.

Por supuesto, ningún alimento contiene todos los nutrimentos, pero desde el punto de vista de su composición química y aporte a la dieta, pueden clasificarse en cinco grandes grupos:

- 1) Semillas de cereales y tubérculos
- 2) Semillas de leguminosas
- 3) Tejidos vegetales frescos (frutas y verduras)
- 4) Alimentos de origen animal
- 5) Leche y sus derivados

Las semillas de cereales y los tubérculos son ricos en almidón. Las semillas de las leguminosas - incluidas las oleaginosas - constituyen la fuente más abundante y barata de proteínas en el mundo. Las frutas y las verduras son con fines prácticos, la única fuente de vitamina C. Los alimentos de origen animal se distinguen por su aporte en proteínas de mejor calidad; al igual que la leche y sus derivados (Bourges, 1984; INEGI, 2000).

Se debe reconocer que la agricultura convencional basada principalmente en la explotación de un número reducido de especies, no es capaz de proporcionar todos los alimentos que la creciente población nacional requiere. De aquí que revistan importancia aquellas investigaciones tendientes a incorporar a muchas especies actualmente silvestres o semisilvestres, como cultivos agrícolas propios para producir recursos alimentarios, y es gracias a este número importante de investigaciones que derivan en el campo de la nutrición y composición de alimentos; que se conoce que la eficiencia en la utilización de las proteínas vegetales puede ser mejorada a un grado considerable mediante mezclas juiciosas y obtención de preparados proteínicos de ellas; en las que los aminoácidos de sus proteínas se complementan, siendo posible asegurar una eficiente utilización por el organismo del suministro de proteínas (Cravioto, 1965; Gómez, 1984).

Dentro de estas especies se encuentran las pertenecientes al género **Cucurbita**; cuyo valor nutritivo se encuentra fundamentalmente en la semilla. En nuestro país, el uso de las semillas de calabaza es común en ciertas regiones; como en el caso de la huasteca potosina.

Se tiene el conocimiento que el consumo de estas semillas es frecuente sobre todo en regiones áridas y semiáridas del país; ya que la planta posee características morfológicas y fisiológicas que le dan una gran resistencia a la sequía (Avila, 1992; Gómez, 1984; Henderson, 1986).

3.2 Descripción del género *Cucurbita*

Las especies de *Cucurbita* son originarias de zonas áridas de México y América Central, de donde fueron distribuidas a América del Norte y Sur. Actualmente se cultivan en diferentes regiones del mundo, como Zambia, Nigeria, Egipto, etc. En donde sus semillas se cuecen, se secan; y suelen consumirse como comida ligera o a manera de nueces, también se usan como complementos de salsas y sopas. Los nombres comunes con que se les conoce son "squash", "pupmking", "myungu" y "marrow" (FAO, 1990; Mansour, 1993; Raymond, 1989).

Las *Cucurbitáceas* son plantas herbáceas, de tallos largos que tienden a arrastrarse en el suelo, y a engancharse en cualquier tipo de soporte, su crecimiento vegetativo es notable; sobre todo el de tallos y hojas.

Dentro de la clasificación botánica que existe, se encuentran las siguientes especies:

- *Cucurbita maxima*. Especie de gran desarrollo vegetativo, de tallos redondos, blandos, de crecimiento indefinido, poco hirsutos, hojas grandes, no lobuladas, cordadas en la base; de flores amarillas y con pedúnculo de inserción en el fruto, de forma cilíndrica y sin surcos. Sus frutos son voluminosos, de 5 a 40 Kg generalmente, de color variable y carne anaranjada.
- *Cucurbita moschata*. De tallos angulosos, erizados, de pelos y crecimiento indefinido, hojas poco levantadas; aterciopeladas en ocasiones con manchas blanquecinas y poco lobuladas, pedúnculo de inserción del fruto ensanchado y con surcos; de flores amarillas, pétalos grandes y erectos, frutos variables de color apagado. Su carne posee el típico sabor "moscado" y suele ser poco dura.

- ***Cucurbita mixta***. De tallo fuerte angular sin asperezas, hojas anchas cordadas, escasamente lobuladas, en ocasiones con manchas blanquecinas. Pedúnculo ancho, pero no ensanchado en la inserción del fruto. De frutos variables, de carne blanda o dura y generalmente de color apagado.
- ***Cucurbita ficifolia***. Planta con gran desarrollo vegetativo. Sus hojas están profundamente lobuladas, sus frutos son redondeados, de color verde oscuro, con retículos blancos de corteza leñosa. La carne del fruto es de consistencia fibrosa.
- ***Cucurbita pepo***. En términos generales, la clasificación taxonómica a esta especie es la siguiente: Familia: ***Cucurbitaceae***, Género: ***Cucurbita*** Especie: ***pepo***, nombre común calabacita. Especie de mayor variabilidad en su aparato vegetativo y en la forma de sus frutos, que pueden ser redondos, piriformes, o alargados. Sus tallos son erectos en sus primeras etapas de desarrollo y después se tornan rastreros. Las hojas se sostienen por medio de peciolo largos y huecos; el limbo es grande y espinoso, presentando muchas veces manchas blancas. Las semillas generalmente son de color blanco, crema o ligeramente cafés (Maroto, 1992; Messiaen, 1979; Valadez, 1994).

3.3 Composición química de la semilla de calabaza

Se sabe que las semillas de las ***Cucurbitas*** poseen entre un 24 a 36% de grasa y un 30 a 35% de proteína, donde el principal componente de la fracción proteínica es una globulina con alto contenido de glutamina, asparagina y arginina. A la proteína principal de la semilla de calabaza, se le ha denominado cucurbitina y se calcula que tiene un peso molecular de 325, 000 Daltons (Henderson, 1996; Naisbitt, 1988).

En cuanto al resto de su composición aproximada; se reportan las siguientes cantidades:

TABLA No. 3
ANÁLISIS PROXIMAL DE SEMILLA DE CALABAZA

Componentes*	g/100gmuestra
Humedad	4.2±0.4
Extracto etéreo	47.0±0.6
Cenizas	4.7±0.1
Fibra	3.1±0.3
Carbohidratos ^a	12.9±0.5

*Todos los valores excepto humedad están expresados en base húmeda

^aLos carbohidratos fueron calculados por diferencia

Además se sabe que el 74% de la semilla corresponde a la porción comestible o almendra, y que cada 100g de almendra cruda, aportan 547 kcal (INEGI, 2000; Sunday and Dickson, 1992).

Tomando en cuenta los altos valores de proteína, se ha realizado la obtención de diferentes preparados de las semillas de calabaza, tales como concentrados y aislados proteínicos; con el fin de mejorar la calidad de la misma (Mansour, 1993).

En cuanto al perfil de aminoácidos indispensables, algunos investigadores reportan que la almendra de calabaza es deficiente, igual que las leguminosas, en aminoácidos azufrados, en aislados se ha observado que se tiene un mayor contenido de aminoácidos indispensables con una calificación química de 77, en los que el primer aminoácido limitante es la isoleucina y el segundo, la valina. Otros investigadores reportan como limitantes a la lisina y treonina. Sin embargo se considera que estas diferencias pueden deberse a la variación interespecie (Cravioto, 1965; Mansour, 1993; Sharma, 1986).

En cuanto a la toxicidad de la semilla de calabaza se han realizado trabajos previos al respecto y no se reporta un contenido elevado de los tóxicos más comunes. Incluso se menciona que se encuentran en cantidades más bajas aún, que las presentes en los preparados de soya (Henderson, 1986; Mansour, 1993; Ostoa, 1997).

En los últimos años se ha incrementado el uso de proteínas vegetales. además de la soya como ingredientes para la elaboración de productos alimenticios, y a consecuencia de esto, ha sido esencial realizar estudios de los diferentes preparados proteínicos, con el fin de conocer el potencial de sus propiedades funcionales. En el caso de la semilla de calabaza, se ha observado que posee características de solubilidad dependientes del pH en el rango de 4 a 10, y que su capacidad de absorción de agua y de aceite es alta, incluso, comparativamente mejor que la que presentan los distintos preparados de soya. En cuanto a capacidad y estabilidad emulsificante y espumante también existen trabajos que indican que posee características adecuadas para que pueda ser utilizada en la elaboración de algún alimento (Adeyemi y Adediran, 1994, Sunday and Dickson, 1992).

3.4 Proteínas

Las proteínas están compuestas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno; además de otros elementos que se pueden encontrar en la estructura proteínica. Están compuestas por aminoácidos, los cuales se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Las proteínas se pueden clasificar según su estructura química en:

- Proteínas simples, producen sólo aminoácidos o sus derivados al ser hidrolizados por ácidos, álcalis o fermentos, por ejemplo, las albúminas.
- Proteínas conjugadas, son polipéptidos que contienen algunas partes no proteínicas denominadas grupos prostéticos, por ejemplo, las nucleoproteínas.
- Proteínas derivadas, son sustancias que resultan del desdoblamiento de proteínas simples o conjugadas, por ejemplo; los dipéptidos (Mitchell, 1978).

Dada la diversidad de las proteínas; estas intervienen en numerosos procesos, por lo cual de acuerdo a la función que realizan, se les puede agrupar de la siguiente manera:

- Función energética, en condiciones normales sólo una pequeña cantidad de la energía que necesitan las células es suministrada por las proteínas, sin embargo, si existen niveles bajos de los otros dos nutrimentos, estas tienen que ser utilizadas como aporte de energía.
- Función plástica, formando parte del esqueleto celular y participando en la construcción de órganos y tejidos
- Función catalizadora, realizada por proteínas llamadas enzimas; que intervienen en diferentes reacciones metabólicas.
- Función mediadora, llevada a cabo por proteínas que actúan como hormonas; transmitiendo información en el organismo.
- Función transportadora, proteínas encargadas de transportar sustancias a través de la sangre y otros líquidos corporales.
- Función contráctil, intervienen las proteínas musculares, permitiendo la contracción de los músculos (Larrañaga, et.al, 1997).

3.4.1 Aminoácidos

Los aminoácidos son las unidades fundamentales de los polímeros proteínicos. Las características comunes de los aminoácidos son la presencia de un grupo carboxilo libre y un grupo amino libre sobre el carboxilo alfa. La actividad óptica de los aminoácidos naturales de las plantas y los animales es la levogira (L).

Debido a que contienen un grupo carboxilo y un grupo amino, se comportan como ácidos débiles y como bases débiles; a un pH fisiológico los aminoácidos existen principalmente como iones híbridos; propiedad que infieren a las proteínas para comportarse como "buffers" (Mora, 1992).

De los aminoácidos que participan en la estructura proteínica; existen algunos que no pueden ser sintetizados por el organismo; y por consiguiente, deben ser aportados por la alimentación en proporciones y cantidades adecuadas; para cubrir las necesidades de conservación orgánica y crecimiento tisular; éstos son los llamados aminoácidos indispensables: fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, valina; y en los primeros años de la vida; también lo es la histidina.

Los aminoácidos considerados dispensables, son aquellos que el organismo puede sintetizar en concentraciones suficientes para cubrir sus necesidades si la cantidad de nitrógeno aportado por las proteínas es satisfactoria. Por lo tanto, los aminoácidos constituyen los factores importantes para estimar el valor nutricional de una proteína (Larrañaga, 1997; Mitchell, 1978).

3.4.2 Requerimientos proteínicos

El metabolismo de las proteínas corporales, puede expresarse por la diferencia entre el aporte y la eliminación de nitrógeno, diferencia que se llama equilibrio nitrogenado o balance de nitrógeno.

Un individuo se encuentra en equilibrio de nitrógeno cuando la ingestión de nitrógeno proteínico iguala al que se pierde en heces y orina. Si se elimina de la dieta un aminoácido indispensable, aparecerá un balance negativo; como es el que se produce durante una desnutrición proteínica, herida o en infecciones. En el hombre adulto, el equilibrio de nitrógeno es igual a cero pues se mantiene aunque el aporte proteico exceda las necesidades corporales; ya que el exceso de proteína se convierte en energía y urea (Cheftell, 1989).

Las necesidades proteínicas de un adulto se calculan determinando el aporte proteínico mínimo, necesario para mantener el equilibrio de nitrógeno. Los niveles de proteína propuestos son aquellos considerados necesarios para mantener la salud y las necesidades fisiológicas de la mayor

parte de individuos de un grupo de población. En la **TABLA No. 4** aparece la ingesta proteínica diaria recomendada por la FAO/OMS/ONU(1985).

TABLA No. 4
REQUERIMIENTOS PROTEÍNICOS DIARIOS^a

Edad (años)	g de proteína/ Kg por día
Lactantes y niños	
0.25-0.5	1.86
0.75-1.0	1.48
2-3	1.13
9-10	0.99
Adolescentes	
10-11	0.99
14-15	0.96
17-18	0.86
Adultos ^b	0.75

^aFuente: FAO/OMS/ONU, 1985

^bDurante la gestación se recomienda que la ingesta proteínica se eleve a 6g/día y en la lactancia una ingesta proteínica diaria adicional de 16 g

Se han revisado diferentes recomendaciones acerca de las necesidades diarias de varios países con respecto a todos los nutrientes; sin embargo, las necesidades reales son de los aminoácidos, y por tanto la composición en aminoácidos de las proteínas de la dieta es extremadamente importante. Además se debe tener en cuenta que las necesidades proteínicas mínimas son una cantidad variable, varían según el sexo, la edad y el estado fisiológico; y que están determinadas por la proporción relativa de aminoácidos indispensables presentes en las proteínas. En consecuencia, la dependencia de una única fuente de proteína puede dar lugar a una ingesta proteínica insuficiente en algunos de los aminoácidos indispensables; por lo cual el ser humano requiere de una fuente proteínica diversificada.

La ingesta de aminoácidos indispensables recomendada por la FAO/OMS/ONU (1985), se muestra en la **TABLA No. 5**, debe tenerse en cuenta que las dosis diarias recomendadas, se basan en

estimaciones para grupos de población y no en las necesidades absolutas de cada individuo (Cheftell, 1989; Mitchell, 1978; Robinson, 1991).

TABLA No.5
REQUERIMIENTOS DE AMINOÁCIDOS INDISPENSABLES
PARA LACTANTES Y ADULTOS^a

Aminoácidos indispensables (g/100g de proteína)	Lactantes	Adultos
Isoleucina	4.6	1.3
Leucina	9.3	1.9
Lisina	6.6	1.6
Metionina+ cistina	4.2	1.7
Fenilalanina + tirosina	7.2	1.9
Treonina	4.3	0.9
Triptofano	1.7	0.5
Valina	5.5	1.3
Histidina	2.6	—
Total	46.0	11.1

^aFuente: FAO/OMS/ONU(1985)

3.4.3 Evaluación de la calidad de las proteínas

La calidad de una proteína alimenticia depende de la naturaleza y cantidades de los aminoácidos que contiene, lo que representa una medida de la eficacia de cómo el organismo puede utilizar esa proteína. Una proteína de alta calidad, contiene los aminoácidos indispensables en proporciones correspondientes a las necesidades humanas y con una alta biodisponibilidad.

Frecuentemente las proteínas de cereales son pobres en lisina, mientras que las de leguminosas son deficientes en metionina. Cuando la distribución en aminoácidos difiere de los requerimientos establecidos; es posible compensar más o menos completamente las deficiencias en aminoácidos mediante un régimen alimenticio que contenga varias proteínas o proporciones complementarias de

aminoácidos. Así, las proteínas de los cereales, pueden complementarse eficazmente con pequeñas cantidades de proteínas de leche o con proteínas de leguminosas.

Teniendo en cuenta que el valor nutritivo difiere para cada proteína; su valoración permite:

- Prever la cantidad de proteínas o de mezclas de proteínas alimenticias necesarias para satisfacer las necesidades de aminoácidos para el crecimiento y el mantenimiento.
- La clasificación de proteínas en función de su valor nutritivo potencial.
- Descubrir las modificaciones nutricionales que las proteínas alimenticias puedan sufrir durante los tratamientos tecnológicos y de almacenamiento.

Para determinar el valor nutritivo de las proteínas se pueden utilizar métodos químicos o biológicos:

a) Métodos químicos

- Cuantificación del perfil de aminoácidos en la proteína a evaluar.
- Cálculo de la calificación química; basada en la comparación del perfil de aminoácidos de la proteína a evaluar con el de una proteína denominada patrón, que presenta una eficiencia de retención de nitrógeno del 100%; cuyos valores están establecidos por los requerimientos de la FAO/OMS/ONU(1985). El aminoácido que está en menor proporción con relación al patrón se denomina limitante, y es el que define la calidad de la proteína.

Esta relación está definida como calificación química (CQ), y queda determinada de acuerdo a la siguiente expresión:

$$CQ = \frac{\text{mg de aminoácidos por g de proteína a evaluar}}{\text{mg de aminoácidos en la proteína de referencia}} \times 100$$

El conocimiento de la calificación química de las proteínas permite calcular su valor de complementación en una mezcla, con el fin de mejorar su valor nutricional (Cheftell, 1989, Mora, 1992).

b) Métodos biológicos

Los ensayos biológicos se basan en medir el crecimiento o la retención de nitrógeno en animales experimentales, de los cuales la rata es un buen modelo biológico. Para que la precisión sea satisfactoria y los datos significativos, hay que utilizar varios animales para cada ensayo e interpretar los resultados estadísticamente normalizando las condiciones experimentales; por lo que es recomendable realizar algunos estudios previos, los cuales están a criterio del investigador; según los alcances que se deseen obtener y los recursos de laboratorio con que se cuenten; estos pueden ser observaciones visuales del estado aparente de salud del animal e incluso exámenes urinarios y hematológicos; los cuales proporcionan datos más reales de las condiciones de los animales empleados.

En cuanto a las dietas empleadas, generalmente se mantiene bajo el nivel proteínico de la ración (en torno al 10% en peso), de forma que el aporte proteínico resulte inferior a las necesidades. También tiene que ser apropiado el suministro de energía y de los restantes nutrimentos. En esas condiciones el crecimiento es lento, la proteína se utiliza eficazmente y los resultados experimentales señalan las diferencias del valor nutritivo de las proteínas estudiadas, reflejando el máximo valor de cada una de ellas.

La medición bajo estas condiciones se le ha denominado Relación de Eficiencia Proteínica (PER); la cual es la ganancia en peso obtenida por las ratas por gramo de proteína consumida.

$$PER = \frac{\text{Ganancia en peso (g)}}{\text{Proteína consumida(g)}}$$

Con frecuencia los valores del PER experimentales se relacionan con los valores de caseína experimental y los obtenidos de la evaluación de un estándar, cuyo valor es de 2.5.

Este valor es fácil de determinar y comúnmente es el método más utilizado; sin embargo surgen errores porque los resultados obtenidos dependen de las cantidades de proteínas efectivamente consumidas y porque no consideran las necesidades proteínicas del mantenimiento normal del animal. La correlación entre los resultados de los bioensayos y de la calificación química, mejora cuando se corrigen, teniendo en cuenta la digestibilidad global de la proteína, que puede ser determinada por medio de ensayos enzimáticos "in vitro", y considerando el valor biológico (Fennema, 1993; Mc.Donald, 1988).

3.4.4 Digestibilidad proteínica

Los aminoácidos de las proteínas presentes en los alimentos, no siempre se encuentran enteramente disponibles, dado que la digestión de la proteína o la absorción de los aminoácidos, pueden resultar incompletas. Los aminoácidos de las proteínas animales suelen ser digeridos y absorbidos en un 90%, en tanto que las de ciertas proteínas vegetales en un 60-70%. En la

TABLA No. 6 se presentan valores de digestibilidad para algunas proteínas.

TABLA No. 6
DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNAS EN EL HOMBRE

Proteínas vegetales	%
Trigo entero	86
Maíz	85
Mijo	79
Arroz brillante	79
Harina de soya	86
Judías	78
Proteínas animales	
Huevos, leche, carne	94-97

Fuente: FAO/OMS/ONU, 1985

La baja utilización de ciertas proteínas puede ser debida a varios factores; entre ellos, los siguientes:

- Conformación de la proteína, las proteínas fibrosas e insolubles son atacadas con menor facilidad por las proteasas que las globulinas solubles
- Fijación de metales, de lípidos, ácidos nucleicos, celulosa u otros polisacáridos pueden dificultar la digestión de las proteínas.
- Presencia de factores antinutricionales, tales como inhibidores de tripsina, o algunos otros, pueden dificultar o disminuir la absorción de aminoácidos
- El tamaño y área superficial de las partículas proteínicas ingeridas; así, por ejemplo, la molienda fina de la harina, tiende a mejorar la digestibilidad de las proteínas de los cereales.
- El procesado a elevadas temperaturas, a pH alcalino, o en presencia de carbohidratos reductores, suele disminuir la digestibilidad proteínica y la disponibilidad biológica de varios aminoácidos, específicamente la lisina.
- También influye la capacidad de digestión y absorción de aminoácidos que cada individuo presente (Fennema, 1993; Robinson, 1991).

Como se ha podido observar, el valor potencial de una proteína puede ser determinado por métodos químicos, pero el valor real sólo puede ser determinado teniendo en cuenta las pérdidas inevitables que tienen lugar durante la digestión, la absorción y el metabolismo, ya que, las primeras pérdidas de una proteína están representadas por la fracción de nitrógeno que no es absorbida y posteriormente se excreta en las heces.

La digestibilidad de una proteína se define con más exactitud como la proporción de nitrógeno que no es excretado en las heces, y que se supone, por lo tanto, que ha sido absorbido. Se expresa generalmente con relación a la materia seca como un coeficiente en forma porcentual

Además de los métodos de digestibilidad "in vivo", se han tratado de reproducir en el laboratorio las reacciones que tienen lugar en el tracto digestivo, de esta manera se han diseñado varias técnicas de digestibilidad "in vitro", las cuales tratan de simular las condiciones de temperatura, pH, tiempo, etc. del organismo. En el caso del método establecido por la AOAC, el fundamento, se basa en la medición de los protones liberados del enlace peptídico durante la proteólisis; lo cual se determina directamente con el pH. Si bien, esta técnica no proporciona un valor real en la mayoría de las veces, sin embargo; representa una primera evaluación predictiva de la digestibilidad de una proteína (AOAC, 1990; Mc. Donald, 1988).

3.5 Parámetros hematológicos

Además de los cuidados obligados que implican el manejo de animales y las condiciones estandarizadas; es necesario verificar el estado de salud de los animales de experimentación, con el fin de reducir las causas de variación durante el experimento. Dentro de esas revisiones previas, se propone el análisis de muestras sanguíneas (Gay, 1965).

La manera más común de tomar la muestra en ratas o ratones, es por medio de un sangrado ocular, mediante capilares heparinizados; la sangre se colecta en tubos Microtiner[®], que contienen EDTA como anticoagulante, generalmente de 300 a 400 μ L son suficientes para medir todas las variables hematológicas.

Los instrumentos más comunes, empleados en el análisis de muestras sanguíneas; son los autoanalizadores, que son capaces de realizar la lectura automática de los diferentes parámetros: cuenta de serie blanca (leucocitos), cuenta de serie roja (eritrocitos, hemoglobina, volumen corpuscular medio (MCV), hematocrito, plaquetas) (Derelanks, 1995). A continuación, se describen de manera general cada uno de los parámetros hematológicos:

Leucocitos(WBC), se miden en miles por microlitro de sangre ($\times 10^3/\mu\text{L}$); su valor expresa posibles infecciones bacteriales o virales, intoxicaciones o infecciones agudas. Cuando se encuentran valores por arriba de los normales se habla de leucocitosis y cuando se encuentra en valores menores a los normales, de leucopenia. El número de leucocitos, depende de diferentes factores, tales como edad, sexo, peso.

Eritrocitos o globulos rojos (RBC), se mide en millones por microlitro de sangre ($\times 10^6/\mu\text{L}$) su función es principalmente el transporte de oxígeno, es importante hacer notar que este parámetro no debe de ser considerado para declarar anemia, en caso de encontrarse valores menores a los normales.

Hemoglobina (Hb), se mide en gramos por decilitro de sangre (g/dL) y representa la cantidad presente de esta proteína por unidad de volumen. Este parámetro debe ser el único empleado para definir la existencia de anemia; ya que cifras menores a las normales, indican dicha patología.

Volumen corpuscular medio(MCV), se mide en femtolitros (fL)es el parámetro más importante de los índices eritrocitario; ya que permite saber si la anemia es macrocítica (MCV mayor a valores normales) o microcítica (MCV menor a los valores normales)

Hematocrito, se mide en porcentaje por unidad de volumen de sangre (%); representa la proporción de eritrocitos total en la sangre. Este parámetro no se mide directamente, sino que se calcula a partir de la medición de eritrocitos y del volumen corpuscular medio; por lo cual, es un parámetro con menor exactitud que el de la hemoglobina y eritrocitos.

Plaquetas, se miden en número de plaquetas por microlitro de sangre, su principal función es intervenir en la coagulación sanguínea. Cuando el numero de plaquetas, se encuentra por arriba del normal, se habla de trombocitosis (Ruiz, 1998).

En la **TABLA No. 7** se muestran los valores normales de los anteriores parámetros en ratas Wistar con un peso de entre 180-250g (Derelanks, 1995).

TABLA No.7
VALORES NORMALES DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS EN RATAS WISTAR

Parámetro	Unidades	Promedio	Rango
Leucocitos (WBC)	(x 10 ³ /μL)	9.92	8.00-11.8
Eritrocitos (RBC)	(x 10 ⁶ /μL)	8.95	8.15-9.75
Hemoglobina (Hb)	(g/dL)	14.6	13.4-15.8
Volumen corpuscular medio(MCV)	(fL)	53.8	49.8-57.8
Hematocrito (PCV)	(%)	47.4	44.4-50.4
Plaquetas	(x 10 ³ /μL)	340	150-450

Fuentes proteínicas

Los procedimientos más significativos para ampliar la disponibilidad de las proteínas, tanto para el consumo humano, como para animales; consisten en incrementar la utilización de las leguminosas y otros vegetales ricos en proteínas. En la **TABLA No. 8** se enlistan algunas fuentes vegetales de proteínas alimentarias.

TABLA No. 8

Contenido proteínico de algunas fuentes vegetales ^a	
Soya	45
Semilla de algodón	25
Cacahuete	25
Semilla de girasol	30
Colza	26
Trigo	14
Avena	13
Maíz	10
Arroz	8
Sorgo	11

^a Unidades: g de proteína/100g de material seco

De la anterior tabla destaca el contenido proteínico de las leguminosas; las cuales han sido tradicionalmente consumidas y constituyen un importante complemento proteínico de los cereales. En casi todas las proteínas de las leguminosas, el contenido de los aminoácidos indispensables lisina y leucina, junto con la arginina es substancial, mientras que el de metionina, cisteína y triptofano es pequeño. Sin embargo, en las proteínas de la harina de soya, y en algunas otras, el contenido de lisina y treonina es también bajo. No obstante, cumplen con las cantidades adecuadas del resto de los aminoácidos indispensables, para ser consideradas una buena fuente de proteína (Fenemma, 1993; Robinson, 1991).

Dentro de las fuentes proteínicas, se encuentran los concentrados y aislados proteínicos; obtenidos generalmente de semillas oleaginosas; que a su vez, contienen altos niveles de proteína. Así tenemos que, las harinas integrales de estas semillas son las formas menos refinadas y contienen entre un 40 a 50% de proteínas.

Las harinas desengrasadas son las más comunes en el mercado; ya que las semillas de las que provienen son destinadas a la producción de aceite, la cual se lleva a cabo mediante una extracción con solventes orgánicos, como el hexano; resultando económicamente ventajosa dicha obtención; ya que, el residuo de esa extracción es un concentrado proteínico. Los concentrados son más refinados que las harinas y contienen un mayor porcentaje de proteínas; en su manufactura se eliminan casi la mitad de los carbohidratos solubles y algunos componentes de menor importancia. Su proceso implica una extracción de las proteínas en su punto isoelectrico; en el que las fracciones globulínicas se insolubilizan y precipitan, posteriormente, se neutralizan y secan. De esta manera, se obtiene un concentrado proteínico que contiene alrededor de 65 a 75% de proteína, 15 a 25% de polisacáridos insolubles, 4 a 6% de minerales y de 0.3 a 1.2 de lípidos.

Los aislados son la forma más purificada, ya que contienen 90% o más de proteínas, se obtienen eliminando los polisacáridos, oligosacáridos y algunos otros componentes de los concentrados. El proceso de aislamiento se basa en las diferencias de solubilidad de las fracciones globulínicas con respecto al pH 7.5-8.5; el residuo insoluble contiene principalmente polisacáridos que se eliminan por centrifugación. El extracto se acidifica, para precipitar la mayor parte de proteína; se centrifuga y se seca. Estos aislados son más caros que los concentrados; dado el proceso adicional (Badui, 1994; Fennema, 1993).

Además de conseguir aumentar la cantidad de proteína, mediante la obtención de estos diferentes preparados proteínicos; se ha visto que mediante los procesos de purificación de la fracción proteínica, se han logrado reducir e incluso eliminar algunos factores tóxicos y antinutricionales, presentes en las semillas vegetales, lo que a su vez, eleva la biodisponibilidad de las proteínas (Mansour, 1993).

3.7 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas

Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, así como su peso molecular, composición y secuencia de aminoácidos, estructura y conformación de la proteína, son consideradas como características que influyen en el comportamiento físico de los alimentos durante su preparación o almacenamiento. En general, a las propiedades fisicoquímicas de las proteínas y a las interacciones que éstas presentan dentro de un sistema alimenticio, se les define como propiedades funcionales. En un solo alimento pueden estar presentes varias propiedades funcionales de una proteína; en la **TABLA No. 9** se muestran algunas de ellas, y los alimentos que las requieren (Fennema, 1993).

TABLA No. 9
PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS

Alimento	Funcionalidad exigida
Bebidas	Solubilidad a diferentes pHs, estabilidad frente al calentamiento, viscosidad
Sopas y salsas	Viscosidad, emulsificación y retención de agua
Productos de panadería	Propiedades viscoelásticas, cohesión, formación de gel, absorción de agua, emulsificación, formación de espuma, pardeamiento
Productos lácteos	Emulsificación, retención de agua, viscosidad, formación de espuma, formación de gel, coagulación
Sucedáneos del huevo	Formación de espuma, formación de gel
Productos cárnicos	Emulsificación, formación de gel, cohesión, retención de agua y grasa
Extensores	Absorción y retención de agua y grasa, cohesión
Productos de repostería	Dispersabilidad, emulsificación

Las propiedades funcionales de las proteínas pueden ser clasificadas en tres grandes grupos:

- Propiedades de hidratación (dependientes de las interacciones proteína-agua)
- Propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína
- Propiedades de superficie

Al primer grupo pertenecen las propiedades tales como la absorción y retención de agua, la humectabilidad, la adhesión, la dispersabilidad, la solubilidad y la viscosidad; a las que con frecuencia se hace referencia con el término propiedades hidrodinámicas. Las propiedades del

segundo grupo participan en procesos tales como la precipitación y la formación de geles y varias otras estructuras. El tercer grupo de propiedades está relacionado fundamentalmente con la tensión superficial, la emulsificación y las características espumantes de la proteína.

Estos tres grupos no son totalmente independientes; por ejemplo, la formación de geles no sólo implica interacciones proteína-proteína, sino también interacciones proteína-agua.

Dado que la predicción de las propiedades funcionales de una proteína, a partir de sus características estructurales, resulta con frecuencia errónea, se hace necesaria su determinación experimental. Las pruebas utilizadas, varían entre medidas precisas de propiedades fisicoquímicas bien definidas a simples ensayos de utilidad. Entre estos dos extremos se sitúa toda una serie de determinaciones que pueden aplicarse a sistemas modelo, como la capacidad de emulsificación, o la absorción de agua de una proteína en polvo, en condiciones controladas.

Generalmente, resulta más fácil entender la funcionalidad proteínica, en un sistema modelo sometido a ensayo; cuando sólo se encuentra presente una proteína, cuya estructura nativa es conocida. Sin embargo, la mayor parte de los ingredientes proteínicos disponibles para fines industriales son mezclas de proteínas y contienen cantidades apreciables de carbohidratos, lípidos, sales minerales, etc. Y aunque la mayoría de los preparados, como los aislados, contienen menos constituyentes no proteínicos; como ya se ha mencionado, suelen ser sometidos a procesos de purificación que pueden afectar tanto la estructura inicial, como la funcionalidad de las proteínas (Fennema, 1993). No obstante, existen varios productos que durante un largo período de tiempo han sido utilizados como ingredientes en sistemas de alimentos, debido al potencial de sus propiedades funcionales; tal es el caso, de los preparados proteínicos de soya. La soya fue la primera fuente de proteína vegetal que fue incorporada como ingrediente en los sistemas de alimentos (Narayana and Narasinga, 1982).

Además de la soya, otras fuentes de proteínas vegetales han sido estudiadas, debido a la capacidad de proporcionar un amplio conjunto de propiedades funcionales; entre ellas, el cacahuete, frijol, la semilla de girasol, algodón, lenteja y algunas semillas de *cucurbitas* (Martínez, 1979; Sunday and Dickson, 1992).

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

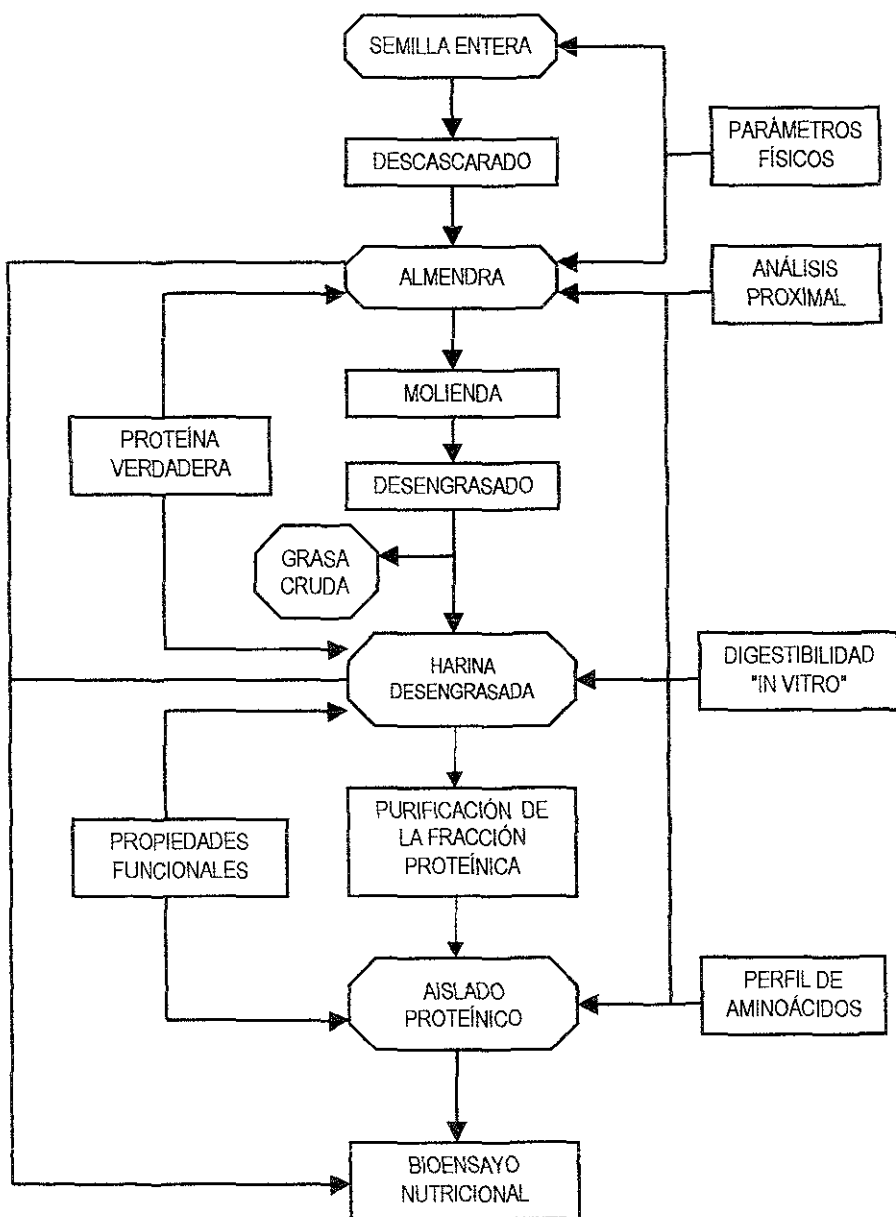


Figura No. 1 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

4.1 Semilla. Se utilizaron aproximadamente 5 Kg de semilla de calabaza, de la especie *Cucurbita pepo* originaria del municipio Aquismón, S.L.P; localidad en la que su consumo es reducido en cierta época del año.

4.2 Descascarado. Se realizó separando la cáscara de la almendra en forma manual; ya que debido al alto contenido de grasa y a que la cáscara se encuentra muy adherida a la almendra no fue posible utilizar algún otro método para descascarar la semilla.

4.3 Parámetros Físicos. Con la finalidad de poder comparar los resultados del presente trabajo, con estudios anteriores en los que se utilizó la misma especie, se determinaron algunos parámetros físicos para corroborar que se trata de la misma variedad (Moreno, 1994); como son peso hectolítrico de la semilla, peso de semilla y almendra, tamaño de semilla y almendra.

- Determinación de peso hectolítrico. Se cuantifica midiendo el peso de una muestra representativa del lote que ocupa un volumen estandarizado (Serna, 1997).

Material

- ✓ Probeta graduada de 100ml, Kimax, NO. 20024
- ✓ Balanza granataria, Sauter

Procedimiento

Tarar la probeta en la balanza granataria y agregar una muestra representativa de semilla correspondiente a 100ml. Esta operación se repitió diez veces con el fin de obtener valores promedio y su desviación estándar.

El resultado de la prueba se reportó en g/100ml.

- Determinación de peso y tamaño de semilla y almendra

Material

- ✓ Balanza analítica Sartorius
- ✓ Vernier

Procedimiento

Se tomó una muestra representativa de 25 semillas y se pesó cada una por separado en la balanza analítica; a ésta misma se le midió el largo y el ancho usando el vernier.

El anterior procedimiento se repitió para otro lote representativo de almendra.

El resultado se obtuvo como el promedio y su desviación estándar.

4.4 Análisis Proximal. Del total de almendra se tomó una muestra homogénea y representativa, que se fraccionó en molino Thomas-Wiley y que pasó por un tamiz de 2mm de diámetro para obtener una harina de almendra integral a la que de acuerdo a los métodos oficiales del AOAC se le determinó: humedad, proteína, grasa, fibra, cenizas y carbohidratos (AOAC, 1990).

- Determinación de humedad

Material

- ✓ Estufa de vacío LAB-LINE, mod 3620
- ✓ Charolas de aluminio
- ✓ Desecador
- ✓ Balanza analítica Sartorius

Procedimiento

Se pone a peso constante la charola de aluminio en la que se va a efectuar la determinación; colocándola en la estufa de vacío de 1 a 2 horas a 60-65°C aproximadamente.

Se adicionan de 2 a 3 g de muestra en la charola y se introduce a la estufa a una temperatura de 100-110°C, de 4 a 8 horas. Se saca la charola, se coloca en un desecador y se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se pesa. El procedimiento anterior se repite hasta que dos pesadas sucesivas no registren una diferencia de 0.001g.

Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde: P_i = Peso de la charola con muestra antes de ser secada (g)

P_f = Peso de charola con muestra seca (g)

m = Peso de muestra (g)

- Determinación de cenizas

Material

- ✓ Muffa THERMOLYNE, mod. 1500
- ✓ Balanza analítica Sartorius
- ✓ Desecador
- ✓ Crisoles de porcelana

Procedimiento

Poner a peso constante los crisoles; colocándolos en la muffa a una temperatura de 500-550°C.

Pesar de 2-3 g de muestra en el crisol y carbonizar a la flama de un mechero bajo una campana, hasta lograr la carbonización completa de la muestra.

Se introduce el crisol en la muffa (500-550°C) el tiempo necesario hasta obtener cenizas homogéneas blancas o grises.

Se dejan enfriar los crisoles, se colocan en un desecador y se pesan a temperatura ambiente.

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde :

P_f = Peso de crisol con cenizas (g)

P_o = Peso de crisol vacío (g)

m = Peso de la muestra (g)

- Determinación de grasa

Material y reactivos

- ✓ Equipo de extracción Golfish, LABCONCO
- ✓ Vasos de borde esmerilado LABCONCO
- ✓ Cartuchos de celulosa 22 x 80 mm
- ✓ Éter de petróleo
- ✓ Estufa de vacío LAB-LINE 3620
- ✓ Desecador
- ✓ Balanza analítica Sartorius

Procedimiento

Se colocan de 2 a 3 g de muestra seca dentro de un cartucho de celulosa y se tapa con una torunda de algodón. El cartucho se coloca en el portadetal, y éste en el seguro metálico del equipo de extracción. Se colocan aproximadamente 50 ml de éter de petróleo en el vaso esmerilado, el cual fue puesto previamente a peso constante y con ayuda del anillo metálico se asegura en el equipo de extracción. Después de transcurrido el tiempo de extracción, aproximadamente 8 horas, dependiendo de la cantidad de grasa que contenga la muestra, se recupera el solvente y se

colocan los vasos en la estufa de vacío para completar la eliminación de solvente y humedad. Se deja enfriar en desecador y se pesa.

Cálculos

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

P_f = Peso del vaso después de la extracción (g)

P_o = Peso del vaso antes de la extracción (g)

m = Peso de la muestra seca (g)

- **Determinación de proteína cruda**

Esta determinación se realiza según el método Kjeldahl, el cual se basa en la oxidación de la materia orgánica mediante una mezcla digestiva (H_2SO_4 , H_3PO_4 , y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) formándose una sal fija de sulfato ácido de amonio (NH_4HSO_4). Posteriormente se realiza una destilación durante la cual se libera amoníaco de dicha sal mediante la adición de NaOH al 40% que se fija en una solución de ácido bórico formándose un borato de amonio, el cual se titula con una solución valorada de ácido clorhídrico 0.01N. De esta forma se obtiene el porcentaje de nitrógeno de la muestra, el cual al multiplicarlo por el factor 6.25, nos da el porcentaje de proteína cruda (AOAC, 1990; Winton, 1967).

Material y reactivos

- ✓ Digestor TECATOR mod. ab 20/40
- ✓ Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC, No. 1030
- ✓ Tubos de digestión de 75 ml
- ✓ Mezcla digestiva (a)
- ✓ Peróxido de hidrógeno al 30%

- ✓ Sulfato de potasio RA
- ✓ Solución de NaOH al 40%
- ✓ Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- ✓ Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada

(a) Mezcla digestiva: Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido ortofosfórico (H_3PO_4), y adicionar con cuidado y resbalando por las paredes 430 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Se deja agitando la muestra durante 30 minutos aproximadamente.

(b) Solución de ácido bórico con indicadores: Pesar 20g de ácido bórico y colocarlos en un matraz aforado de dos litros, se adiciona agua destilada hasta disolver y se agregan 20 ml de verde de bromocresol (100mg en 100ml de CH_3OH) y 14 ml de rojo de metilo (10mg 100ml de CH_3OH), se mezcla vigorosamente.^a

Procedimiento

Se pesan de 20 a 80 mg de muestra (dependiendo del contenido de proteína) en papel copia y se introducen en el tubo de digestión, se adiciona aproximadamente 0.5g de K_2SO_4 , se agregan 3ml de mezcla digestiva y se coloca en el digestor a una temperatura de 370°C durante 15 minutos; pasado el tiempo, se saca, se deja enfriar y se agregan 1.5 ml de H_2O_2 (30%). Se vuelve a colocar el tubo en el digestor hasta que la digestión termine; esto es, cuando el contenido sea traslúcido o incoloro.

Terminada la digestión se deja enfriar; se agregan 25 ml de H_2O destilada y se coloca en el equipo AutoKjeldahl; el cual dará la lectura de los ml gastados en la titulación de la muestra; que servirán para conocer el % de nitrógeno, contenido en la misma.

^a Se utilizó metanol (CH_3OH) debido a que el equipo de destilación lo especifica en su manual de operación.

Además de introducir los tubos conteniendo la muestra se debe de preparar de igual manera un blanco; donde se sustituya la muestra por 70 mg de glucosa o sacarosa.

Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{ml muestra} - \text{ml blanco}) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína cruda} = \%N \times 6.25$$

Donde:

N = normalidad de solución de HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (g)

- Determinación de fibra

Material y reactivos

- ✓ Aparato de digestión de fibra LABCONCO
- ✓ Estufa de vacío LAB-LINE mod 3620
- ✓ Mufia THERMOLYNE mod 1500
- ✓ Vasos Berzelius de 600 ml
- ✓ Crisoles de porcelana
- ✓ Filtro tipo California No. 30305-062
- ✓ H_2SO_4 al 1.25 % (P/V)
- ✓ NaOH al 1.25 % (P/V)
- ✓ Antiespumante (SIGMA)
- ✓ Alcohol etílico RA

Procedimiento

Se pesan de 3 a 5 g de muestra desengrasada en un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de silicato de aluminio y perlas de vidrio. Se le adiciona 200 ml de H_2SO_4 al 1.25 % que este hirviendo, y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se coloca en el aparato de digestión; el cual se encuentra previamente calentado; se deja digerir durante 30 minutos exactos. Posteriormente vaciar el contenido sobre un filtro tipo california y se realiza la filtración con ayuda de vacío; el residuo se lava con agua caliente destilada, hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 ml). Una vez lavado el residuo, se transfiere nuevamente al vaso Berzelius, y se agregan 200 ml de NaOH al 1.25% que se encuentra caliente, y por otros 30 minutos se coloca en el aparato de digestión. Se lava con agua destilada hasta eliminar el alcalí (aprox. 500 ml). Por último, el residuo se lava con 25 ml de alcohol etílico.

El residuo se pasa a un crisol de porcelana (a peso constante) de manera cuantitativa, se coloca en la estufa de vacío para secar, una vez que se encuentre seco, se pesa, se carboniza y se introduce en la mufla para su incineración; hecho esto último, se vuelve a pesar el crisol.

Cálculos

$$\% \text{ Fibra} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

Donde:

P_s = Peso de crisol con residuo después del secado (g)

P_c = Peso de crisol con residuo después de calcinado (g)

m = Peso de muestra (g)

- Determinación de carbohidratos. Este valor se obtiene de manera teórica por diferencia al restar al 100% la sumatoria de los porcentajes obtenidos de los otros componentes:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100\% - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Grasa} + \% \text{ Proteína} + \% \text{ Fibra})$$

4.5 Desengrasado. Debido a que la almendra de calabaza tiene un alto contenido de grasa (>40%), solamente se fraccionó a un tamaño de partícula de 2 a 3mm de diámetro con el fin de evitar la pérdida de grasa cruda en una molienda fina. La extracción de la fracción lipídica se realizó en un dispositivo tipo Soxhlet, que puede procesar aproximadamente de 1 a 2 Kg de material, usando hexano como disolvente de extracción. Una vez que se obtuvo la micela (grasa-disolvente), se separó el disolvente de la grasa, de tal forma que se obtuvo tanto la grasa cruda como la harina desengrasada de la almendra de calabaza.

4.6 Proteína Verdadera. Debido a que el contenido de proteína se calcula determinando el porcentaje de nitrógeno, mediante el método Kjeldahl; y éste a su vez cuantifica en nitrógeno bajo cualquier forma. Al calcular el contenido de proteína en un alimento a partir de su nitrógeno, se parte de dos supuestos: que todo el nitrógeno del alimento está en forma de proteínas y que todas las proteínas del alimento contienen 16gN/ 100g de proteína. Lo anterior es cierto en proteínas de origen animal; sin embargo, en las fuentes de proteína de origen vegetal hay presente un contenido significativo de nitrógeno no proteínico. Las distintas proteínas de los alimentos tienen diferentes proporciones de nitrógeno y, por lo tanto habría que usar factores distintos para transformar el contenido de nitrógeno en proteína según el alimento que se trate. Sin embargo; el uso de un factor medio de conversión se considera que en la práctica está justificado. El supuesto de que la totalidad del nitrógeno de los alimentos está en forma de proteínas es también falso, ya que pueden existir muchos compuestos nitrogenados sencillos, diferentes a los aminoácidos; como amidas, alcaloides, sales de amonio, etc.; por tal motivo, es necesaria la determinación de proteína verdadera (Mc. Donald, 1988).

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico; así como de la proteína soluble y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación por medio del método Kjeldahl.

Material y reactivos

- ✓ Digestor TECATOR, mod. ab20/40
- ✓ Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC No. 1030
- ✓ Tubos de digestión de 75ml
- ✓ Balanza analítica Sartorius
- ✓ Agitador magnético CORNING
- ✓ Papel Whatman, No. 542
- ✓ Mezcla digestiva: Se mezclan durante aproximadamente 30 min. los siguientes reactivos: 3g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 300 ml de H_2SO_4 (concentrado) Y 100 ml de H_3PO_4 .
- ✓ Solución de H_2O_2 al 30%
- ✓ Solución de ácido bórico 1% con indicador: Se disuelven 20 g de ácido bórico en 2 litros de agua destilada, se agregan 20 ml de verde de bromocresol (100 mg en 100 ml de CH_3OH), agregar 14 ml de rojo de metilo (100mg en 100 ml de CH_3OH) y agitar.
- ✓ Solución de HCl 0.01N valorado
- ✓ Solución precipitante: Disolver 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 20ml de agua destilada, añadir 22 ml de HCl 2N, mezclar y aforar a 50 ml con agua destilada.

Procedimiento

- a) Proceso de precipitación: pesar 50-100 mg de muestra finamente molida y colocarla en un vaso de precipitado de 50 ml. Agregar 5ml de agua caliente y agitar mecánicamente por 15 minutos, agregar 2ml de la solución precipitante y dejar reposar por 10 minutos; transferir

cuantitativamente para su filtración en papel Whatman No. 50 o 542 utilizando agua destilada caliente y ligera succión.

- b) Proceso de digestión: colocar el papel filtro con el precipitado en el tubo de digestión, al cual se agregan 0.5g de K_2SO_4 , 5 ml de mezcla digestiva, se coloca en el digestor y se espera a que se enfríe para añadirle 3ml de H_2O_2 al 30%, se introduce nuevamente en el digestor y se calienta a una temperatura de $370^{\circ}C$, hasta que la digestión sea completa.
- c) Destilación y titulación: después de la digestión se deja enfriar, y se agregan 25 ml de agua destilada, se coloca el tubo en el microdestilador, y la destilación y titulación se efectúan automáticamente.

Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{ml muestra} - \text{ml blanco}) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína verdadera} = \%N \times 6.25$$

Donde:

N = normalidad de solución de HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (g)

4.7 Purificación de la Fracción Proteínica. Después de obtener la harina desengrasada; la cual puede ser considerada como un concentrado proteínico (70% de proteína), se obtuvo un purificado proteínico, o también llamado aislado; el cual puede contener hasta un 90% de proteína (Robinson,1991).

Material y reactivos

- ✓ Centrífuga BECKMAN J2-21
- ✓ Botellas de centrifuga de 500 ml
- ✓ Homogenizador CAFRAMO mod. RZR1
- ✓ Estufa FELISA mod. 293A
- ✓ Vasos de precipitado de 2L
- ✓ Embudo buchner y kitasato
- ✓ Papel pellón
- ✓ Solución de NaCl 0.2N
- ✓ HCl 2N
- ✓ NaOH 2N

Procedimiento

Pesar 100g de harina desengrasada y disolver en 2L de NaCl 0.2N, ajustar a pH 13 con NaOH 2N. Agitar en el homogenizador a una velocidad constante de 130 r.p.m. durante 30 minutos, manteniendo la temperatura a 0°C. Transcurrido el tiempo de agitación, se filtra con ayuda de vacío a través de papel pellón. El filtrado se ajusta a pH 5 con HCl 2N para precipitar la proteína en su punto isoeléctrico. El precipitado se deja en reposo a refrigeración durante aproximadamente 30 minutos y después se centrifuga a 5000 r.p.m. durante 20 minutos, a 0°C. Se separa el precipitado y el sobrenadante se vuelve a mantener en refrigeración por espacio de 30 minutos, con el fin de volver a centrifugar y aumentar el rendimiento de la obtención de aislado.

El aislado obtenido se seca durante aproximadamente 12 horas a 50-60°C (Paredes, 2001).

4.8 Digestibilidad "In Vitro". Una primera evaluación predictiva de la calidad nutritiva de una fuente proteínica, lo constituye la proporción de aminoácidos que son factibles de ser liberados, por acción del sistema enzimático "in vitro" que simule la acción de enzimas digestivas.

Durante la proteólisis son liberados protones de enlace peptídico; por lo tanto, el cambio en el pH estará directamente relacionado a la digestibilidad de la proteína (AOAC, 1990).

Material y reactivos

- ✓ Parrillas de agitación magnética
- ✓ Vasos de doble camisa
- ✓ Mangueras
- ✓ Baño de temperatura
- ✓ Solución A: Pesar exactamente 227,040 BAEE unidades de tripsina (tipo IX), 1860 BAEE unidades de α -quimiotripsina (tipo II) y 0.520 unidades de peptidasa L-leucina β - naftilamina. Disolver en 10 ml de agua destilada.
- ✓ Solución B: Pesar 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana y disolver en 10 ml de agua destilada.

A continuación se muestran los cálculos realizados para la preparación de la solución A y B, respectivamente:

Solución A:

- Tripsina(tipo IX) contiene 94% de proteína y 17,700BAEE unidades/mg proteína

$$\frac{1 \text{ mg proteína}}{17,700 \text{ unidades BAEE}} \times 227,040 \text{ unidades BAEE} = 12.8271 \text{ mg de proteína}$$

$$\frac{100 \text{ mg tripsina (tipo IX)}}{94 \text{ mg proteína}} \times 12.8271 \text{ mg proteína} = 13.6458 \text{ mg de tripsina (tipo IX)}$$

- α -quimiotripsina (tipo II) contiene 51 BAEE unidades/ mg sólido

$$\frac{1 \text{ mg sólido}}{51 \text{ unidades BAEE}} \times 1860 \text{ unidades BAEE} = 36.4705 \text{ mg de } \alpha\text{-quimiotripsina (tipo II)}$$

- Peptidasa contiene 102 unidades BAEE/ g sólido

$$\frac{1000 \text{ mg sólido}}{102 \text{ unidades BAEE}} \times 0.520 \text{ unidades BAEE} = 5.0980 \text{ mg de peptidasa}$$

Solución B:

- Proteasa contiene 5.5 unidades BAEE/ mg sólido

$$\frac{1 \text{ mg sólido}}{5.5 \text{ unidades BAEE}} \times 65 \text{ unidades BAEE} = 11.8181 \text{ mg de proteasa}$$

Procedimiento

Pesar 10 mg de nitrógeno de la proteína a ensayar, disolver y aforar con 10 ml de agua destilada, y agitar durante 1 hora manteniendo la temperatura a 37°C. Posteriormente ajustar el pH a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH 0.1N. Se agrega 1 ml de la solución A; la cual debe encontrarse a 37°C, se agita durante 10 minutos exactos a la misma temperatura, y transcurrido el tiempo agregar 1 ml de la solución B (debe estar a 37°C) y agitar 9 minutos exactos cambiando la temperatura 55°C. Transcurrido el tiempo; se cambia la agitación a la temperatura de 37°C durante 1 minuto. Una vez terminado el tiempo se mide el pH exactamente a los 20 minutos después de haber adicionado la solución A.

Con el fin de obtener resultados confiables se realiza una determinación previa, usando como proteína de referencia caseína; cuyo valor de pH, debe ser de 6.42 ± 0.05 , después de someterla a la acción del sistema multienzimático.

Cálculos

$$\% \text{ DIGESTIBILIDAD} = 234.84 - 22.56 (\text{pH})$$

4.9 Perfil de Aminoácidos. A los diferentes preparados de la almendra de calabaza se les determinó la composición de aminoácidos. La cuantificación de los aminoácidos de la proteína en estudio, se realiza previa hidrólisis ácida de la proteína a 145°C por 4 horas, y separación cromatográfica en un autoanalizador de aminoácidos TECHNICON mod. NC-2P (Lucas and Sotelo, 1982). Para tener completo el perfil de aminoácidos indispensables, fue necesario cuantificar por separado el triptófano, lo cual se realizó mediante una hidrólisis básica y su posterior cuantificación espectrofotométrica (Lucas and Sotelo, 1980).

Material y reactivos

- ✓ Autoanalizador de aminoácidos TECHNICO mod. NC-2P
- ✓ Digestor TECATOR mod. ab 20/40
- ✓ Tubos de hidrólisis ácida
- ✓ Potenciómetro CORNING mod. 10
- ✓ Rotavapor BUCHI mod. R
- ✓ Vortex LAB-LINE mod. 1290
- ✓ Adaptación para fijación de jeringa Millipore XX30-012-00
- ✓ Membrana Millipore HATF-02500 ($0.45\mu\text{M}$)
- ✓ Microjeringa Hamilton, mod. 1001-LTN

- ✓ HCl 6N
- ✓ Estándar de norleucina
- ✓ Metil Celosolve al 50%
- ✓ Amortiguador de acetato de sodio 4N: colocar 3 litros de agua destilada en agitación y adicionar lentamente 1312 g de acetato de sodio anhidro para prevenir la cristalización, si se requiere se puede calentar para la completa solubilización de la sal. Añadir 400 ml de ácido acético glacial lentamente, se deja enfriar y aforar a 4 litros.
- ✓ Sulfato de hidracina: disolver 1.049g de sulfato de hidracina en agua destilada y desionizada, adicionar 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado (R.A.) y 30 ml de solución BRIJ-35 al 20%, llevar esta solución a un volumen de 4 litros; para su conservación se requiere adicionar 0.8 ml de ácido caprílico.
- ✓ Ninhidrina: disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de metilcelosolve, adicionar lentamente 1 litro del amortiguador de acetato de sodio 4N, y llenar a un volumen de 4 litros.
- ✓ Solución lavadora: agua-etanol (3:1; v/v) con hidroquinona al 0.01% como agente oxidante.
- ✓ Amortiguador de dilución: se prepara una solución de HCl 0.2N (A) y una solución de NaCl 0.2M (11.69 g/l) (B), se lleva a 200 ml con agua desionizada y se adiciona hidroquinona al 0.01%. El pH de este amortiguador debe ser de 1.5 ± 0.05 .
- ✓ Hidróxido de sodio 0.1 N
- ✓ Amortiguadores para la corrida del hidrolizado ácido ^a

^a En la siguiente página se muestra la TABLA No. 10 donde aparece la composición de cada uno de los amortiguadores utilizados

TABLA No. 10
COMPOSICIÓN DE AMORTIGUADORES

REACTIVO (grado analítico)	BUFFER # 1 Regeneración de la resina	BUFFER # 2 Elución de a.a. ácidos y neutros	BUFFER # 3 Elución de a.a. básicos	NaOH 0.2N Lavar la resina
Acetato de sodio anhidro CH_3COOH , PM = 82.03	4.1 g	5.0 g	87.0g	
Ácido acético glacial CH_3COOH , PM = 60.05	20 ml	15ml	20ml	
Solución de acetato de zinc $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05M		1.2ml	2.0ml	
Alcohol etílico absoluto $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, PM =46.02	78ml	78ml		
Alcohol bencílico PM = 108.14			11ml	
Hidroquinona PM = 110.1	0.11g	0.11g		
Solución BRIJ-35 al 20% MERCK # 1962	8.0ml	8.0ml	8.0ml	
EDTA (sal disódica) PM = 372.24	0.1 g			0.1g
NaOH (lentejas) PM = 40				8.0g
Ácido caprílico PM = 144.22	0.2ml	0.2ml	0.2ml	
Agua desionizada	1.01ml	1.01ml	1.01ml	1.01ml
pH (ajuste en potenciómetro)	3.9	4.1	5.4	
Concentración de Na^+	0.05M	0.06M	1.06M	0.20M
Concentración de Zn^{+}		$3 \times 10^{-4} \text{ M}$	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	

Procedimiento

- a) Preparación de la muestra: pesar dentro del tubo de hidrólisis la cantidad finamente molida y desengrasada, adicionar la cantidad de ácido requerida, humedeciendo totalmente la muestra.

$$A = \frac{0.05 \times 100}{\%P}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\%P}$$

Donde: A= cantidad de muestra en gramos

B = ml de HCl 6N

%P = porcentaje de proteína en la muestra

Se insufla nitrógeno y se cierra el tubo perfectamente con el tapón.

- b) Hidrólisis de la muestra: se coloca el tubo con la muestra en el digestor a $145^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 4 horas.
- c) Concentrado del hidrolizado: una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar y se transvasa cuantitativamente a un matraz bola de 100 ml, lavando el tubo con agua caliente y solución lavadora. Se agregan 5 ml de norleucina (estándar). El hidrolizado se concentra en el rotavapor a una temperatura de $75-80^{\circ}\text{C}$, llevándolo dos veces a sequedad; con el fin de eliminar el exceso de ácido clorhídrico; a continuación se concentra el hidrolizado en el tercer lavado a un volumen menor de 25ml.
- d) Filtrado del precipitado: el hidrolizado se filtra a través de papel filtro Whatman de poro cerrado sobre buchner y kitasato al vacío; se aconseja dar un lavado con solución lavadora. Posteriormente se afora a 25 ml; ajustando a un pH de 6.8 ± 0.2 con NaOH 5N.

e) Inyección de la muestra: se diluye el hidrolizado en una proporción de 1:1, se filtra a través de un Millipore, descartando las primeras gotas del filtrado y el restante se utiliza para inyectar en el autoanalizador de 100 a 200 μ l.

Cálculos

Previamente se corre una solución estándar de aminoácidos con una concentración de 0.025 μ M de cada uno; para que de éste aminograma se pueda obtener el área de cada uno de los aminoácidos. Además se debe inyectar una cantidad constante y conocida del estándar y de la muestra. Los cálculos están basados en los equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

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

Donde:

EN_{aa} = Equivalentes de norleucina del aminoácido correspondiente

AN_{STD} = Área de norleucina estándar

AA_{STD} = Área del aminoácido correspondiente en el estándar

Del aminograma del hidrolizado de la muestra, se calcula el área bajo la curva de cada uno de los aminoácidos; así como el área norleucina en el correspondiente aminograma, para lo anterior es conveniente trabajar con la mitad superior de cada uno de los picos, con el fin de evitar trabajar con la línea base que en ocasiones es demasiado irregular.

A continuación se tienen los cálculos a desarrollar para cada uno de los aminoácidos, en donde se expresa su contenido en mg del aminoácido / g de nitrógeno en la muestra:

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

$$Mg_{aa} / gN = \frac{(A_{aa} \times EN_{aa} \times \mu M \times PM_{aa} \times A)}{(AN_m \times a \times MgN_m)}$$

Donde:

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

B_{aa} = Base de la mitad del pico

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

EN_{aa} = Equivalentes de norleucina del aminoácido correspondiente

μM_{aa} = Micromoles del aminoácido en el estándar

PM_{aa} = Peso molecular del aminoácido

A = Aforo al que se llevó el hidrolizado en ml

AN_n = Área de norleucina en el aminograma de la muestra

a = Aliquota inyectada en ml

MgN = Miligramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada

4.9.1 Determinación de Triptofano. Debido a que la hidrólisis ácida destruye el triptofano, y a que es el único aminoácido que no se puede leer conjuntamente en equipos como autoanalizador o HPLC en hidrólisis ácidas; su determinación se realiza por medio de hidrólisis alcalinas o enzimáticas y se cuantifica por medio de técnicas colorimétricas (UNAM; 1982).

Material y reactivos

- ✓ Digestor TECATOR mod. ab 20/40
- ✓ Tubos de hidrólisis alcalina con rosca
- ✓ Tubos de ensaye
- ✓ Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER, mod.340
- ✓ Potenciómetro CORNING mod. 10

- ✓ Hidróxido de litio 4N
- ✓ Ácido fosfórico concentrado
- ✓ Ácido clorhídrico concentrado
- ✓ Solución lavadora (3:1 agua-etanol v/v)
- ✓ Solución estándar de triptófano (0.05 mg / ml)
- ✓ Solución de p-dimetilamino benzaldehído (DMAB) al 0.5% en HCl conc.
- ✓ Solución de nitrito de sodio al 0.2%

Procedimiento

De acuerdo a las siguientes formulas se adiciona la cantidad de muestra y de LiOH 4N en un tubo de hidrólisis.

$$A = \frac{0.1 \times 100}{\%P}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\%P}$$

Donde:

A = cantidad de muestra (g)

B = ml de LiOH 4N

%P = Porcentaje de proteína en la muestra

Se insufla nitrógeno y se coloca en el digestor a una temperatura de 145°C durante 4 a 8 horas, según el contenido de proteína de la muestra. Transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar y el contenido se transfiere a un vaso de precipitado, lavando con solución lavadora para tener un volumen menor a 25 ml. Se ajusta a pH de 6.8 ± 2 con ácido fosfórico concentrado, y se filtra al vacío con papel Wathman No. 542. Se afora a 25 ml.

La curva estándar se elabora tomando 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0ml de solución estándar, llevando los tubos a 2 ml y adicionando 7.5 ml de DMAB en HCl. Para el blanco se toman 2 ml de muestra y 7.5 ml de HCl conc.

Para los tubos de muestra se toman 2 ml del hidrolizado y se agregan 7.5 ml de DMAB, por duplicado. Tanto los tubos de la curva patrón, como de la muestra se agitan y se dejan en la obscuridad durante 15 minutos. Después se agregan 0.5ml de nitrito de sodio al 0.2%, se agitan y se dejan otros 15 minutos en la obscuridad. Se lee a 590 nm contra blanco.

4.10 Bioensayo Nutricional. La calidad nutritiva de la proteína de los diferentes preparados de la almendra de calabaza, se evaluó mediante la Relación de Eficiencia Proteínica (PER); definida como la ganancia en peso debida a la ingesta de proteínas por un animal en crecimiento. Se emplea una dieta con un contenido de 10% de proteína que se administra a ratas macho recién destetadas durante un periodo de 28 días (Cheftel J., 1989; Mc. Donald, 1988).

Con el fin de establecer condiciones estandarizadas en los animales del estudio; se realizó una prueba de citometría hemática al inicio del ensayo, la cual permitió detectar posibles anomalías o evidencia de alguna enfermedad en las ratas utilizadas. La citometría hemática, se llevó a cabo de la siguiente manera:

La extracción de sangre se obtuvo mediante un sangrado ocular; para lo cual, primeramente se anestesió al animal, introduciéndolo en un frasco pequeño, en cuyo interior se coloca algodón humedecido con éter etílico. Una vez anestesiado, se sujeta con una mano y con la otra se le introduce un capilar heparinizado en la parte posterior del ojo, se comienza a ejercer una ligera presión y se rota suavemente el capilar, la sangre se colecta en un tubo Microtiner® y se requieren entre 250 y 500 μ L. Es importante que al momento de colectar la sangre se rote suavemente el tubo para evitar la formación de coágulos. Las muestras colectadas fueron analizadas por la M. en C. Adriana Ruiz, jefa de sección del IMSS, área de hematología.

Material y equipo

- ✓ Ratas macho Wistar recién destetadas
- ✓ Estante de jaulas individuales
- ✓ Balanza granataria para animales de laboratorio
- ✓ Balanza granataria de un platillo
- ✓ Comederos y bebederos para rata

Procedimiento

Las dietas con las que se llevó a cabo el estudio biológico fueron formuladas de acuerdo a la información obtenida de la calificación química (CQ); respecto a los aminoácidos que resultaron limitantes en la almendra de calabaza *Cucurbita pepo* y en base a un 10% de proteína.

Los animales se distribuyeron en lotes de 6 ratas cada uno en jaulas individuales de acuerdo a una distribución de "culebra-japonesa"; la cual consiste en pesar individualmente los animales al inicio del ensayo y con sus pesos ordenados de manera ascendente o descendente se asignan en los diferentes lotes de manera zigzagante, con el fin de tener una diferencia de peso promedio entre los lotes de menos de 1 gramo. (Conca, 1995)

El ensayo se realiza durante 28 días colocando las dietas de experimentación correspondientes y agua "*ad libitum*", además de la dieta control (caseína); durante el ensayo se lleva un control del incremento en peso y del alimento ingerido de cada uno de los animales.

Al final del ensayo se realizó de nuevo la citometría hemática, de la forma antes descrita. Otro parámetro usado para determinar daños ocasionados por la dieta administrada a los animales en estudio, es la presencia de cambios en los pesos porcentuales de órganos y sus posibles anomalías patológicas; por lo cual, se realizó la necropsia al final del experimento (Gay, 1965; Lee et.al, 1979).

Cálculos

Con los datos obtenidos se calculó la Relación de Eficiencia Proteínica (PER):

$$PER = \frac{\Delta P}{\Sigma AI * F}$$

Donde:

ΔP = Incremento en peso (g)

ΣAI = Alimento ingerido total (g)

F = % de proteína en la dieta / 100

Con los valores de PER obtenidos se calculó el PER ajustado según la siguiente fórmula:

$$PER_{ajustado} = PER_{exp} \times \frac{PER_{caseína (ref)}}{PER_{caseína (exp)}}$$

Donde:

PER caseína (ref) = 2.5

4.10.1 Digestibilidad "in vivo"

Otro de los parámetros que se obtienen del ensayo biológico es el de la digestibilidad "in vivo"; la cual se define como la proporción de una proteína que es absorbida por el tracto gastrointestinal, medida por la relación del nitrógeno retenido y del ingerido en la dieta (Mora, 1992). Esta determinación es de mayor valor que la que proporciona la digestibilidad "in vitro"; sin embargo, ambas permiten tener un indicador de la calidad de las proteínas. Por tal motivo, durante el ensayo biológico se determinó este parámetro.

Material

- ✓ Digestor TECATOR, mod. ab20/40
- ✓ Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC No. 1030
- ✓ Tubos de digestión de 75ml

- ✓ Mortero con pistilo
- ✓ Balanza analítica Sartorius
- ✓ Mezcla digestiva (a)
- ✓ Peróxido de hidrógeno al 30%
- ✓ Sulfato de potasio RA
- ✓ Solución de NaOH al 40%
- ✓ Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- ✓ Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada

(a) Mezcla digestiva: Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido ortofosfórico (H_3PO_4), y adicionar con cuidado y resbalando por las paredes 430 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Se deja agitando la muestra durante 30 minutos aproximadamente.

(b) Solución de ácido bórico con indicadores: Pesar 20g de ácido bórico y colocarlos en un matraz aforado de dos litros, se adiciona agua destilada hasta disolver y se agregan 20 ml de verde de bromocresol (100mg en 100ml de CH_3OH) y 14 ml de rojo de metilo (10mg 100ml de CH_3OH), se mezcla vigorosamente.

Procedimiento

Se recolectaron las heces de las ratas empleadas en la determinación del PER durante la última semana y se registró el peso de éstas, así como del alimento consumido durante su recolección.

Una vez recolectadas las heces se secan a una temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$, se pesan y se muelen en mortero. Se determina el contenido de nitrógeno en heces y en las dietas evaluadas siguiendo el procedimiento para determinar proteína cruda.

Cálculos

El cálculo de digestibilidad se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$D = \frac{N_{\text{absorbido}}}{N_i} = \frac{N_i - N_h}{N_i} \times 100$$

Donde:

D= Digestibilidad

N_i = Nitrógeno ingerido

N_h= Nitrógeno en heces

4.11 Propiedades Fisicoquímicas. Los preparados proteínicos de diferentes fuentes vegetales son ampliamente usados en la elaboración de alimentos; siendo sus propiedades funcionales las que determinan en gran medida su aceptación (Lin et.al, 1974; Martínez, 1979). Por tal motivo, en este trabajo se evaluaron algunas de ellas, como son; humectabilidad, capacidad de retención de agua (CRA), pH, volumen de sedimentación y viscosidad.

Esta evaluación se realizó tomando como referencia preparados similares de soya, y con el fin de tener una idea de las características del aislado y concentrado proteínico de la almendra de calabaza *Cucurbita pepo*.

4.11.1 Humectabilidad. Definida como la capacidad de las harinas o polvos para humedecerse cuando se ponen en contacto con el agua (Aguirre y González, 1993).

Material

- ✓ Vasos de precipitado de 100 ml
- ✓ Parrillas de agitación magnética

Procedimiento

El siguiente procedimiento se realizó con los preparados proteínicos de *C.pepo*, usando como referencia aislado y concentrado de soya.

1. Pesar 1g de muestra proteínica
2. Transferir la muestra a un vaso de precipitado de 100 ml conteniendo 80 ml de agua destilada y un agitador magnético. Previamente, la muestra se pasa a través de un tamiz pequeño de 1mm de diámetro, con el fin de que se disperse completamente en la superficie del agua. Observar su comportamiento inmediatamente después de haberla adicionado. Ver **Figura No.2**

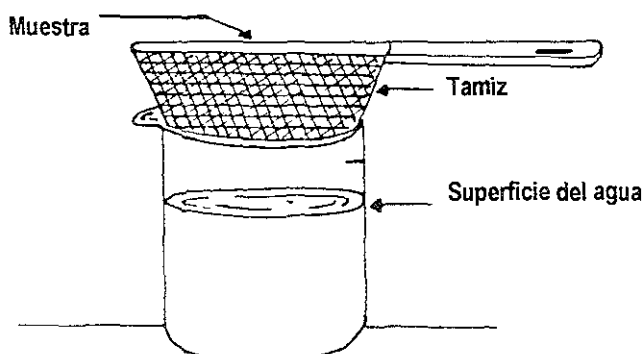


Figura No.2 DISPERSIÓN DE MUESTRA POR EL TAMIZ

3. Después de 30 minutos, agitar la muestra mediante agitación magnética, lo suficientemente rápido para formar un torbellino que alcance la base del vaso. Mantener la agitación de medio minuto a un minuto.
4. El grado de humectabilidad se evalúa como sigue:

Excelente : el polvo se humecta tan pronto como se pone en contacto con el agua, aún sin agitación. Después de 30 minutos la muestra se dispersa completamente(p.ej la hanna de soya)

Buena: el polvo se humedece ligeramente cuando se pone en contacto con el agua. Después de 30 minutos la muestra está húmeda y el polvo tiene una zanja en la base. La agitación dispersa la muestra.

Adecuada: el polvo se humedece muy ligeramente al contacto inicial y tiende a conglomerarse y permanecer en la superficie (p.ej. la caseína). Después de 30 minutos, la muestra se encuentra aún en la superficie, a pesar de que algo de ella está dispersa. La agitación causa que la mayoría de la muestra se disperse, y al término de ella todavía existen algunos conglomerados de muestra. (p.ej. Promine D)

Pobre: el polvo se humedece con dificultad al contacto inicial y se aglomera. Después de 30 minutos la solución se enturbia ligeramente, pero la mayoría de la muestra permanece en la superficie aglomerada. La agitación del paso 3 no dispersa la muestra. Después de parar la agitación, la mayoría de la muestra se encuentra flotando en conglomerados (p.ej. caseinato de sodio) (Regenstein, 1984).

4.11.2 Capacidad de retención de agua (CRA). Es la medición de la cantidad de agua que se retiene por un material sólido en presencia de un exceso de disolvente después de la aplicación de una fuerza centrífuga (Chefftel, 1989).

Material

- ✓ Centrifuga BECKMAN J2-21
- ✓ Tubos de centrifuga con base redonda de 50 ml
- ✓ Balanza analítica Sartorius
- ✓ Parrilla de agitación magnética
- ✓ Agitador magnético (2.0 x 0.3 cm)

Procedimiento

Esta determinación se realizó por duplicado usando como referencia aislado y concentrado de soya.

1. Tarar un tubo de centrifuga de 50 ml conteniendo un agitador magnético (Peso inicial)
2. Pesar 1 gramo de muestra proteínica y adicionarla en el tubo de centrifuga previamente tarado
3. Adicionar 30 ml de agua destilada en el tubo y dispersar con agitador magnético, durante aproximadamente 5 minutos, empleando una parrilla de agitación magnética; según se muestra en la **Figura No. 3**

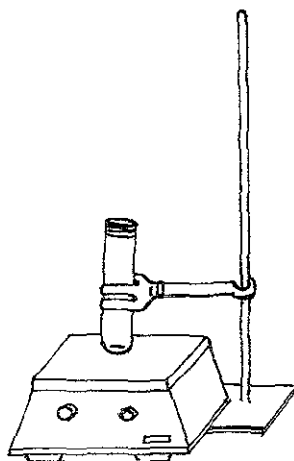


Figura No. 3 AGITACIÓN DE LA MUESTRA

4. Ajustar a pH 7
5. Dejar en reposo 10 minutos
6. Centrifugar la muestra a 15000 r.p.m. por 10 minutos a 25°C y decantar el sobrenadante
7. Pesar el tubo de centrifuga (Peso final)

Cálculos

$$\text{CRA} = \frac{\text{Diferencia de peso (g)}}{1 \text{ g de muestra}}$$

$$\text{Diferencia de peso} = \text{peso del tubo después de centrifugación} - \text{peso inicial} - 1$$

Los resultados se obtienen como gramos de agua retenida en 1g de muestra (Regenstein, 1984).

4.11.3 Determinación de pH. Este parámetro es importante ya que está directamente relacionado con la solubilidad de las proteínas; y frecuentemente es una de las primeras propiedades que se miden en cada una de las etapas de preparación y procesado de un ingrediente proteínico (Fennema, 1993; Cheffé, 1989).

Material y reactivos

- ✓ Solución al 1% de proteína de cada una de las muestras a evaluar
- ✓ Soluciones buffer de pH 4 y 7
- ✓ Potenciómetro CORNING mod. 10
- ✓ Vasos de precipitado de 100 ml
- ✓ Parrillas de agitación magnética

Procedimiento

1. Se pesa la cantidad necesaria de las muestras para tener una solución al 1% de proteína de cada uno de los preparados de la almendra de calabaza y de los preparados de soya; éstos últimos empleados como referencia.
2. Se agita cada solución mediante agitación magnética, suave y constante durante 10 minutos; con el fin de que se homogeneice completamente.
3. Una vez que se tiene el potenciómetro calibrado; se toma la lectura de pH de cada una de las soluciones.

Volumen de sedimentación. Es la relación entre el volumen del sedimento y el volumen total de la suspensión; está expresado como $F = V_u / V_0$

Donde :

F= volumen de sedimentación

V_u = volumen del sedimento

V_0 = volumen total de la suspensión

El volumen de sedimentación (F) ocupa valores entre 0-1, y se considera que cuando $F=1$ se trata de una suspensión ideal; ya que no presenta sedimento visible; por tanto, cuando F se acerca más a la unidad, el producto se hace más aceptable porque el volumen del sobrenadante se reduce progresivamente. El volumen de sedimentación, está relacionado con la estabilidad de la solución (Remington, 1987).

Material

- ✓ Solución al 1% de proteína de cada una de las muestras a evaluar
- ✓ Probeta de 100ml, KIMAX No.20024-D
- ✓ Parrilla de agitación magnética THERMOLYNE-MULTI-STIR
- ✓ Vasos de precipitado de 100 ml
- ✓ Cronómetro

Procedimiento

1. Se pesa la cantidad necesaria de las muestras, para tener una solución al 1% de proteína de cada uno de los preparados de la almendra de calabaza y se emplean como referencia los preparados de soya.
2. Se coloca cada solución en un vaso de precipitado de 100ml y se agita durante 5 minutos exactos a 1000 r.p.m. mediante agitación magnética.
3. Una vez transcurrido el tiempo de agitación, inmediatamente se agrega la solución a la probeta de 100 ml; la cual se deja en reposo hasta 60 minutos, midiendo el volumen de sedimento a los 15, 30 y 60 minutos. Y se realiza el cálculo de F con los valores obtenidos.

4.11.5 Viscosidad. Esta definida como la oposición de un líquido a fluir, y es un parámetro relacionado con la consistencia de los alimentos líquidos (Cheftel, 1989).

Material

- ✓ Viscosímetro BROOKFIELD, mod. LV
- ✓ Vasos Berzelius de 600 ml

Procedimiento

1. Primeramente se procede a ensamblar el viscosímetro; para lo cual, se coloca en una superficie plana e inmóvil. Se introduce la varilla metálica en el orificio de la base, después se pasa el cable de la conexión eléctrica a través del orificio de la nuez, y ésta se inserta en la varilla metálica por la parte contraria de la base. Ver **Figura No.4**

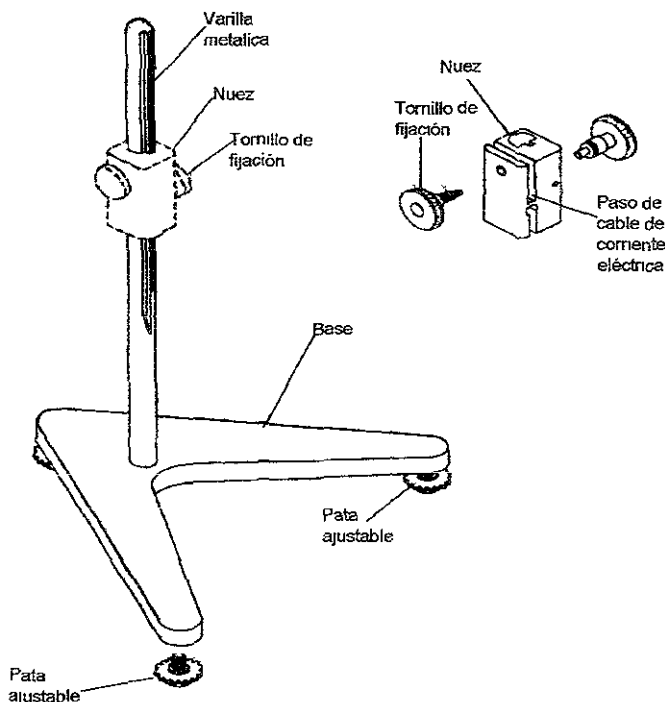


Figura No.4 DIAGRAMA PARA ENSAMBLE DEL VISCOSÍMETRO

2. Una vez, que se tiene armado el soporte, se introduce la varilla metálica del cuerpo del viscosímetro por el mismo orificio donde se pasó el cable de conexión eléctrica
3. A continuación se desliza la nuez, a través de la varilla metálica con ayuda del tornillo de fijación; hasta una altura cómoda, para el evaluador.
4. Mediante la rotación de los tornillos que se encuentran en las patas de ajuste, se nivela la gota que se encuentra en el cuerpo del viscosímetro, a similitud de la nivelación de burbuja en una balanza analítica.
5. Una vez nivelado el viscosímetro se coloca la aguja seleccionada, según la muestra a evaluar; asegurándose de que se encuentre bien ajustada.
6. Se coloca el vaso Berzelius, y por medio de los tornillos de ajuste se introduce la aguja en la muestra hasta que alcance la marca indicada en la aguja, evitándose el contacto de ésta, con las paredes del vaso. (Es importante señalar que se requiere de una probeta especial en la que se coloca la muestra; para este caso se utilizó un vaso Berzelius de 600 ml)
7. Se prende el rotor, y se deja estabilizar la muestra durante 5 minutos exactos. Pasado el tiempo se apaga el rotor y al mismo instante se acciona la palanca de velocidad hacia abajo, procurando que la aguja lectora se coloque en el área del visor de lectura. En la **Figura No. 5** se muestra el viscosímetro ensamblado completamente.

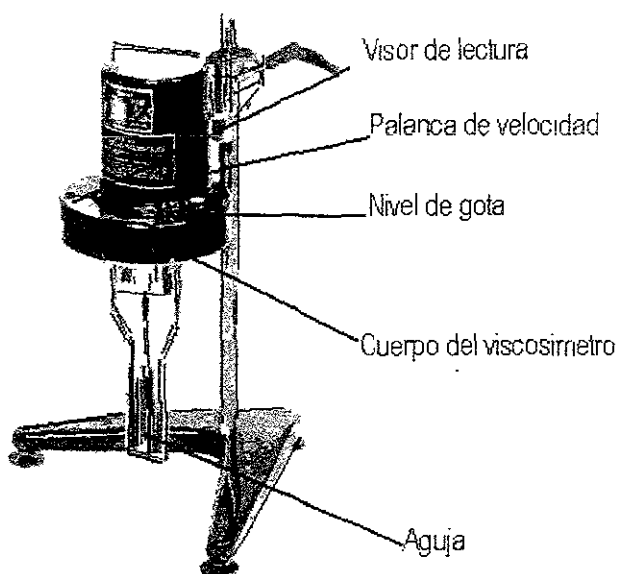


Figura No. 5 VISCOSÍMETRO DE BROOKFIELD MOD. LV

8. Una vez que se tome la lectura, se debe anotar el número de la aguja que se está utilizando y la velocidad de rotación (r.p.m.) usada.
9. Otro dato importante que se debe considerar es la temperatura de las muestras; por lo cual debe registrarse en el momento de las mediciones.

Cálculos

Para convertir la lectura a centipoises (Cp) es necesario contar con la velocidad de giro en r.p.m., número de aguja utilizada y factores de conversión del viscosímetro empleado; en éste caso, se utilizó el modelo LV; cuyos factores se muestran en la **TABLA No. 11**

TABLA No. 11
FACTORES DE CONVERSIÓN USADOS PARA VISCOSÍMETRO LV

r.p.m.	No. aguja 1	No. aguja 2	No. aguja 3	No. aguja 4
0.3	2×10^2	10^3	4×10^3	2×10^4
0.6	10^2	5×10^2	2×10^3	10^4
1.5	40	2×10^2	8×10^2	4×10^3
3.0	20	10^2	4×10^2	2×10^3
6.0	10	50	2×10^2	10^3
12.0	5	25	10^2	5×10^2
30.0	2	10	40	2×10^2
60.0	1	5	20	10^2

Así tenemos que:

$$\text{Viscosidad en Cp} = L \times F$$

L= lectura de la muestra

F= factor de conversión de acuerdo a las r.p.m. y al No. de aguja

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Parámetros físicos

- La proporción en peso almendra-cáscara de la semilla de calabaza *Cucurbita pepo* fue de 69.23 ± 1.62 y 30.64 ± 1.68 respectivamente; estos valores se obtuvieron del promedio y desviación estándar de cuatro lotes con 25 muestras cada uno. Dicha proporción en valores reales indica que, de aproximadamente 5 Kg de semilla; se pueden obtener 3.5 Kg de almendra y 1.5 Kg de cáscara.

- Peso hectolitrico: 28.86 ± 0.887 g/100ml

La medida del peso hectolitrico de la semilla se obtuvo del promedio de 10 mediciones y su desviación estándar.

- Peso y tamaño de semilla y almendra de calabaza:

TABLA No. 12

	SEMILLA	ALMENDRA
Peso (g)	0.15 ± 0.1	0.14 ± 0.5
Largo (cm)	2.13 ± 0.1	1.92 ± 0.2
Ancho (cm)	1.04 ± 0.1	0.74 ± 0.0

De acuerdo a los resultados obtenidos de esta evaluación; y a la comparación con los reportados en trabajos anteriores, se puede verificar que se trata de la misma especie.

5.2 Análisis proximal

Una vez obtenidos el concentrado y aislado proteínico; se realizó el análisis proximal, junto con la almendra. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la **TABLA No. 13**

TABLA No. 13

ANÁLISIS PROXIMAL DE LA ALMENDRA, CONCENTRADO Y AISLADO DE LA ALMENDRA DE CALABAZA (g/100g muestra)^a

Preparados	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteína	Fibra	Carbohidratos ^b
Almendra	3.90±2.23	3.60±0.50	42.33±1.43	39.32±0.68	7.10±2.95	3.75
Concentrado	5.80±1.86	6.47±0.42	3.32±2.65	70.80±1.39	7.90±2.37	5.72
Aislado	5.27±1.43	5.37±2.57	0.33±2.85	87.84±0.69	1.12±1.50	0.07

^a Todos los valores están dados en base húmeda

^b Los carbohidratos fueron calculados por diferencia

Del análisis proximal realizado a la almendra de calabaza se corroboró que partimos de una materia prima con un alto contenido en grasa y proteína con valores de 42.33 y 39.32% respectivamente. Lo que nos permite considerar a la almendra de calabaza *Cucurbita.pepo* como una semilla oleaginosa y proteaginosa

Al eliminar el extracto etéreo, la concentración de la proteína (componente de mayor importancia en este estudio) se incrementa hasta un 71%, lo que permite que esta harina sea considerada como un auténtico concentrado proteínico (Robinson, 1991).

Respecto al aislado, su contenido de proteína se incrementa hasta un 87% resultando tener un valor similar al del aislado de soya, reportado en la literatura. (Wang and Zayas, 1992). En la **Figura No. 6** se puede observar claramente como se va incrementando el porcentaje de proteína en los diferentes preparados.

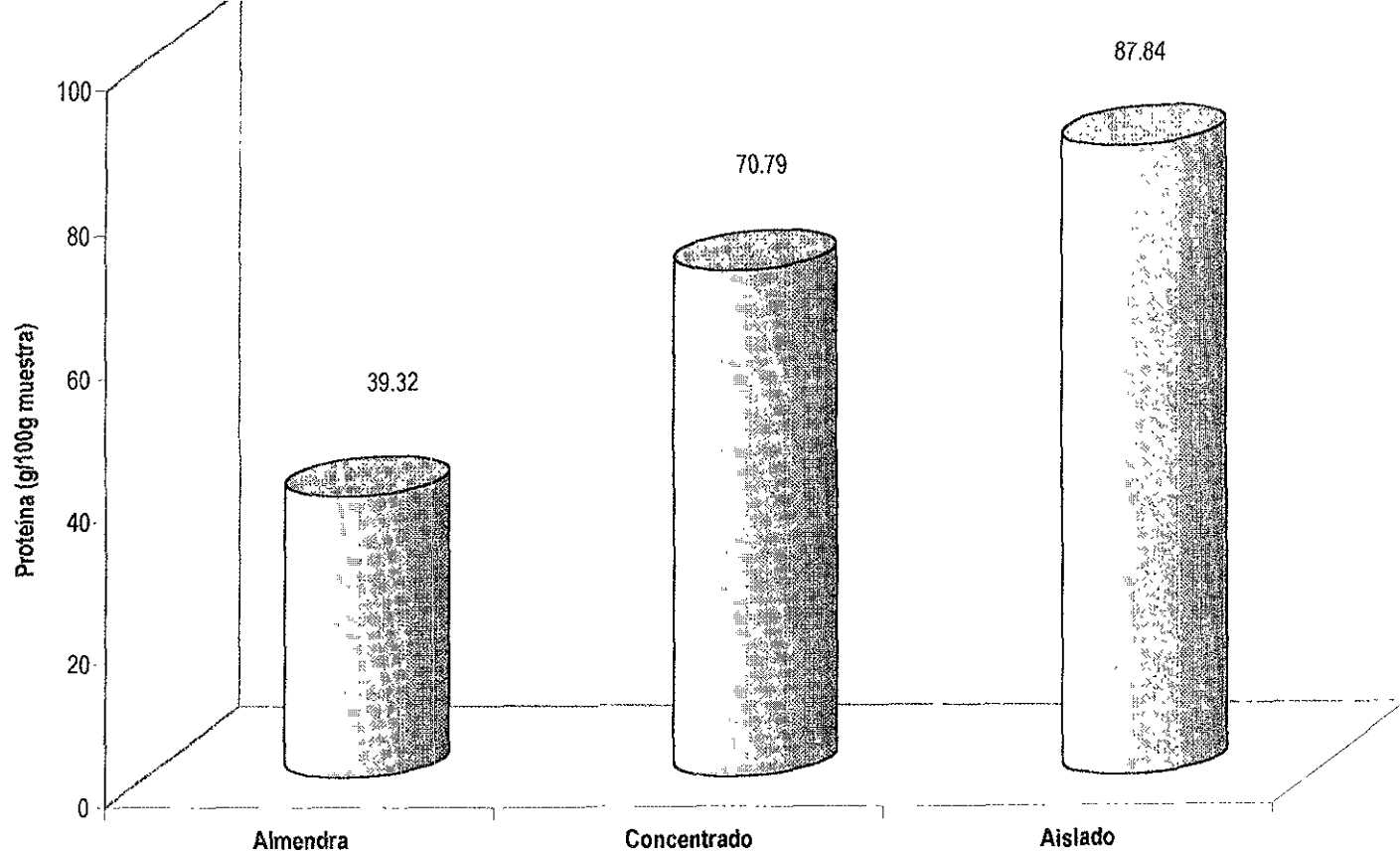


Figura No.6 CONTENIDO DE PROTEINA EN LOS DIFERENTES PREPARADOS DE LA ALMENDRA DE CALABAZA (*Cucurbita pepo*)

5.3 Proteína verdadera

Esta determinación dio como resultados 30.82% y 65.27% de proteína verdadera en almendra y concentrado, respectivamente; lo que indica que la almendra de calabaza contiene un 78.40% de nitrógeno proteínico, mientras que en el concentrado; aproximadamente el 92% de nitrógeno proviene de estructuras proteínicas.

TABLA No. 14
PROTEÍNA VERDADERA DE ALMENDRA Y CONCENTRADO DE *Cucurbita pepo*
(g/100g muestra)

Fracción	Proteína Cruda	Proteína Verdadera
Almendra	39.32	30.82
Concentrado	70.79	65.27

5.4 Digestibilidad "in vitro"

Los datos obtenidos de la digestibilidad "in vitro" muestran que el aislado proteínico presentó la mayor digestibilidad (95%) y la harina de la almendra o harina integral, fue la que tuvo la menor (88.2%); sin embargo al realizar el análisis estadístico que consistió en el análisis de varianza de una vía (ANOVA), junto con la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan), la harina integral y el concentrado (89.66%) no mostraron diferencia significativa entre ellas; pero sí la hubo con respecto al aislado. En la **Figura No.7** se muestra la digestibilidad "in vitro" de las tres porciones de la almendra de calabaza.

Considerando que en la literatura se reportan valores de digestibilidad para la harina de soya de 86%(Robinson, 1991), se puede aseverar que las tres fracciones evaluadas presentan una buena biodisponibilidad de la fracción proteínica, sobre todo el aislado proteínico de la almendra de calabaza.

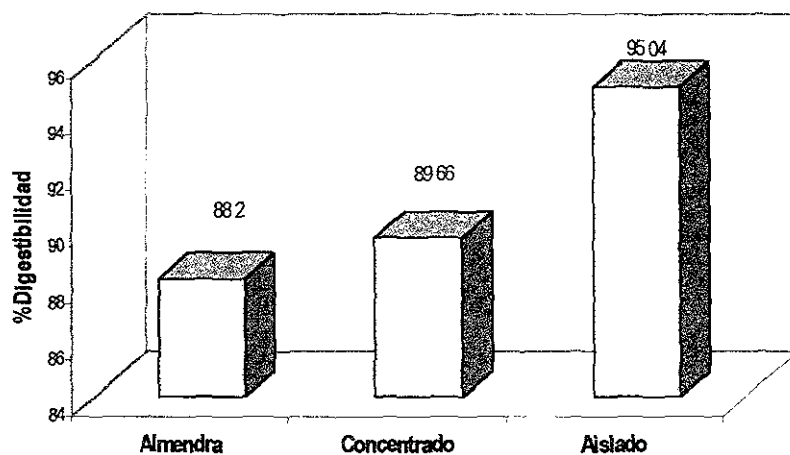


Figura No. 7 DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DE LOS DIFERENTES PREPARADOS DE *Cucurbita pepo*

5.5 Perfil de aminoácidos

En la **TABLA No.15** se muestra el contenido de aminoácidos en el concentrado y aislado protéinico de la almendra de calabaza. Tomando como referencia trabajos anteriores, se observa que se presentan valores similares a los reportados (Paredes, 2001).

TABLA No. 15

**CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS EN CONCENTRADO Y AISLADO DE LA ALMENDRA
DE CALABAZA (*Cucurbita pepo*)**

Aminoácidos	Concentrado de proteína (g de aminoácido / 16 gN)	Aislado de proteína (g de aminoácido / 16 gN)
Acido aspártico	3.18	2.39
Ácido glutámico	22.88	18.62
Arginina	15.48	11.72
Cistina	0.99	0.89
Fenilalanina	4.27	4.37
Glicina-alanina	25.38	24.25
Histidina	2.30	2.55
Isoleucina	2.85	2.29
Leucina	5.98	6.64
Lisina	5.19	4.28
Metionina	2.01	2.14
Prolina	3.10	3.19
Serina	2.68	3.23
Tirosina	3.25	3.64
Treonina	3.65	3.34
Triptofano	1.12	1.34
Valina	4.02	3.17

5.5.1 Calificación Química

El objetivo del perfil de aminoácidos es obtener valores que permitan realizar una comparación entre el patrón establecido de una proteína de referencia (FAO/OMS/ONU, 1985) y la proteína a evaluar; con la finalidad de predecir su calidad biológica. Con este fin se determina la calificación química (CQ) para los aminoácidos presentes en los preparados de la almendra de calabaza, el aminoácido que se encuentre en menor proporción con relación al patrón, se denomina limitante.

En la **TABLA No. 16** se muestra la calificación química de dichos preparados y los requerimientos establecidos por la FAO/OMS/ONU de 1985.

TABLA No. 16

CALIFICACIÓN QUÍMICA DEL CONCENTRADO Y AISLADO PROTEÍNICOS DE *Cucurbita pepo**

Aminoácidos	Concentrado		Aislado		Requerimientos FAO (g/100g proteína)	
	Lactantes	Adultos	Lactantes	Adultos	Lactantes	Adultos
Azufrados	92.11	58.78	95.72	61.59	4.2	1.7
Aromáticos	134.82	131.85	147.66	145.82	7.2	1.9
Histidina	114.15	-----	130.08	-----	2.6	1.6
Isoleucina	79.90	73.01	66.00	60.88	4.6	1.3
Leucina	83.02	104.85	94.80	120.86	9.3	1.9
Lisina	101.53	108.4	86.12	92.50	6.6	1.6
Treonina	109.63	135.18	103.10	128.39	4.3	0.9
Triptófano	85.09	74.66	104.60	92.66	1.7	0.5
Valina	94.39	102.98	76.48	84.28	5.5	1.3

* Los datos resaltados en negritas indican la CQ y el correspondiente aminoácido limitante

Según la calificación química, en la **TABLA No. 16** se observa que los aminoácidos limitantes resultaron ser los azufrados y la isoleucina; tanto en el concentrado como en el aislado proteínico de la almendra de calabaza; sin embargo, con una buena suplementación se puede lograr que dichos preparados sean una buena fuente de proteína; ya que cumplen con los requerimientos del resto de los aminoácidos. Cabe resaltar que estos resultados concuerdan con los presentados por Mansour (1993); quien menciona como primer aminoácido limitante a la isoleucina. Aunque existen otros autores que encuentran como limitantes a la lisina (Cravioto, 1965; Paredes, 2001), sin embargo estas diferencias se pueden deber a la propia variación interespecie.

5.6 Bioensayo Nutricional

5.6.1 Formulación de dietas

De acuerdo a la calificación química de los preparados de la almendra de calabaza; estos resultaron ser deficientes en azufrados e isoleucina. Por lo que, para obtener una buena suplementación y compensar su deficiencia en dichos aminoácidos, las dietas elaboradas para llevar a cabo el ensayo biológico fueron las siguientes:

1. Dieta control, empleando como fuente de proteína caseína (CRL)
2. Dieta de harina integral (HI)
3. Dieta de concentrado proteínico (CONC)
4. Dieta del aislado proteínico (A)
5. Dieta de aislado proteínico, suplementada con la adición de metionina e isoleucina (AMI)
6. Dieta de aislado proteínico suplementada con arroz (AA)

Todas las dietas se ajustaron a la dieta propuesta en la metodología; cuyo contenido es de 10% de proteína; siendo ésta la denominada como dieta control. En la **TABLA No. 17** se muestra la composición de cada una de las dietas.

TABLA No. 17
FORMULACIÓN DE DIETAS EMPLEADAS EN EL ENSAYO BIOLÓGICO
(g/100g de dieta)

Ingrediente	CRL ^(a)	HI ^(a)	CONC ^(a)	A ^(a)	AMI ^(a)	AA ^(a)
Contenido de proteína ^(b)	11.04±0.4	10.16±0.5	10.79± 0.1	10.07±0.9	9.54±0.1	9.86±0.2
Caseína (87.41%)	11.44					
Harina integral (39.32%)		25.43				
Concentrado proteínico(70.79%)			14.12			
Aislado proteínico (87.84%)				11.39	11.39	5.69
Metionina					0.24	
Isoleucina					0.1	
Harina de arroz						58.82
Aceite de maíz	10.73	-----	9.53	10.72	10.72	9.98
Mezcla de minerales	4.93	4.05	4.08	4.39	4.39	4.69
Mezcla de vitaminas	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Dextrina (maizena comercial)	66.24	65.52	65.44	66.43	66.09	13.37
Agua	3.86	4.0	4.18	4.4	4.4	4.7
Celulosa	1.8	-----	1.6	1.6	1.6	1.7

^(a) Descripción de las siglas usadas.

CRL: Control,

HI: Harina integral

CONC: Concentrado proteínico

A: Aislado proteínico

AMI: Aislado proteínico, suplementado con metionina e isoleucina

AA: Aislado proteínico, suplementado con harina de arroz

^(b) Contenido de proteína en dietas, determinado experimentalmente

5.6.2 Resultados de Relación de Eficiencia Proteínica (PER)

Se utilizaron 36 ratas macho, de la raza Wistar, de aproximadamente 3 semanas de edad, cuyos pesos oscilaban entre 30-55g. Los animales se distribuyeron en 6 lotes de 6 ratas cada uno.

En la **TABLA No. 18** se presentan los resultados de los parámetros más importantes obtenidos del ensayo biológico, así como de los valores de PER experimental y ajustado para cada una de las dietas evaluadas.

TABLA No. 18
RESULTADOS DE ENSAYO BIOLÓGICO^a

Dieta	Ganancia en peso(g) ^b	Alimento ingerido (g)	PER _{experimental}	PER _{ajustado}
Control (CRL)	2.87 ±0.71	253.91±43.0	3.03±0.59 ^A	2.50
Harina Integral (HI)	1.31±0.29	200.83±37.4	1.74±0.19 ^B	1.43
Concentrado proteínico (CONC)	0.77±0.20	163.31±33.2	1.19±0.29 ^C	0.98
Aislado proteínico (A)	1.98±0.48	253.26±38.6	2.10±0.40 ^B	1.73
Aislado, metionina, isoleucina (AMI)	1.68±0.37	229.08±52.7	2.10±0.30 ^B	1.73
Aislado y harina De arroz (AA)	1.55±0.48	220.81±45.4	1.89±0.24 ^B	1.56

^a Para evaluar cada dieta se emplearon 6 ratas por lote

^b Se expresa como el promedio de la ganancia en peso individual de las 6 ratas empleadas en cada lote

^c Diferente letra indica diferencia significativa ($\alpha=0.05$)

Según los resultados obtenidos se observa que la mayor ganancia en peso después de la dieta control se obtiene con la dieta de aislado proteínico (A), siguiendo en orden la dieta suplementada con aminoácidos (AMI), la suplementada con harina de arroz (AA), la de harina integral (HI) y por último la elaborada con el concentrado proteínico (CONC); así mismo estos valores se ven reflejados en el PER obtenido; ya que el mayor valor experimental lo presentan la dieta del aislado(A) y la adicionada con aminoácidos (AMI). Lo anterior, se puede observar claramente en la **Figura No.8**

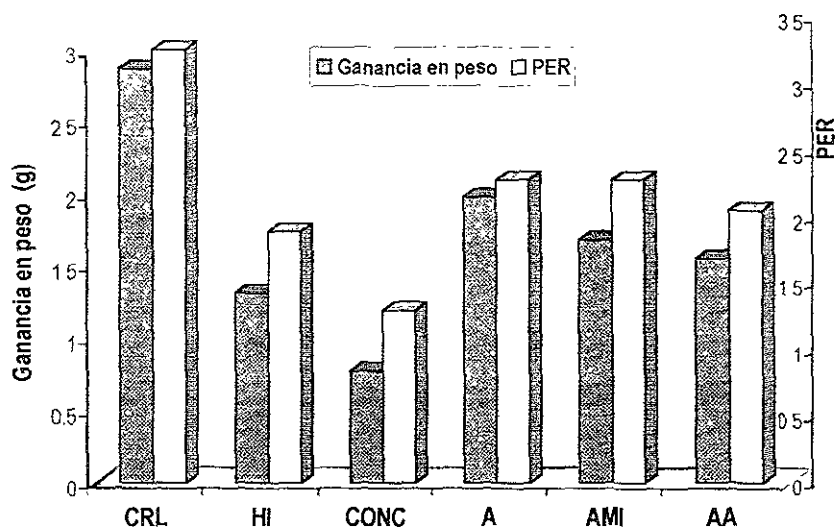


Figura No.8 RESULTADOS DEL ENSAYO BIOLÓGICO

Al realizar el análisis estadístico que consistió en el análisis de varianza de una vía (ANOVA), y la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan); se encuentra que existe diferencia significativa entre las dietas evaluadas y el control, sin embargo, las dietas de preparados a base del aislado proteínico (A, AA, AMI) no presentaron diferencia significativa; no obstante, tienen un mayor valor con respecto a la dieta de harina integral (HI). La dieta de concentrado, presentó diferencia significativa con respecto al control y a las demás dietas. Es decir, la dieta con la que se obtiene la menor ganancia en peso y por consecuencia la menor relación de eficiencia proteínica es con la dieta de concentrado proteínico

Los resultados obtenidos en este estudio se pueden observar claramente en la **Figura No. 9** donde se muestran las curvas de crecimiento de los diferentes lotes de animales.

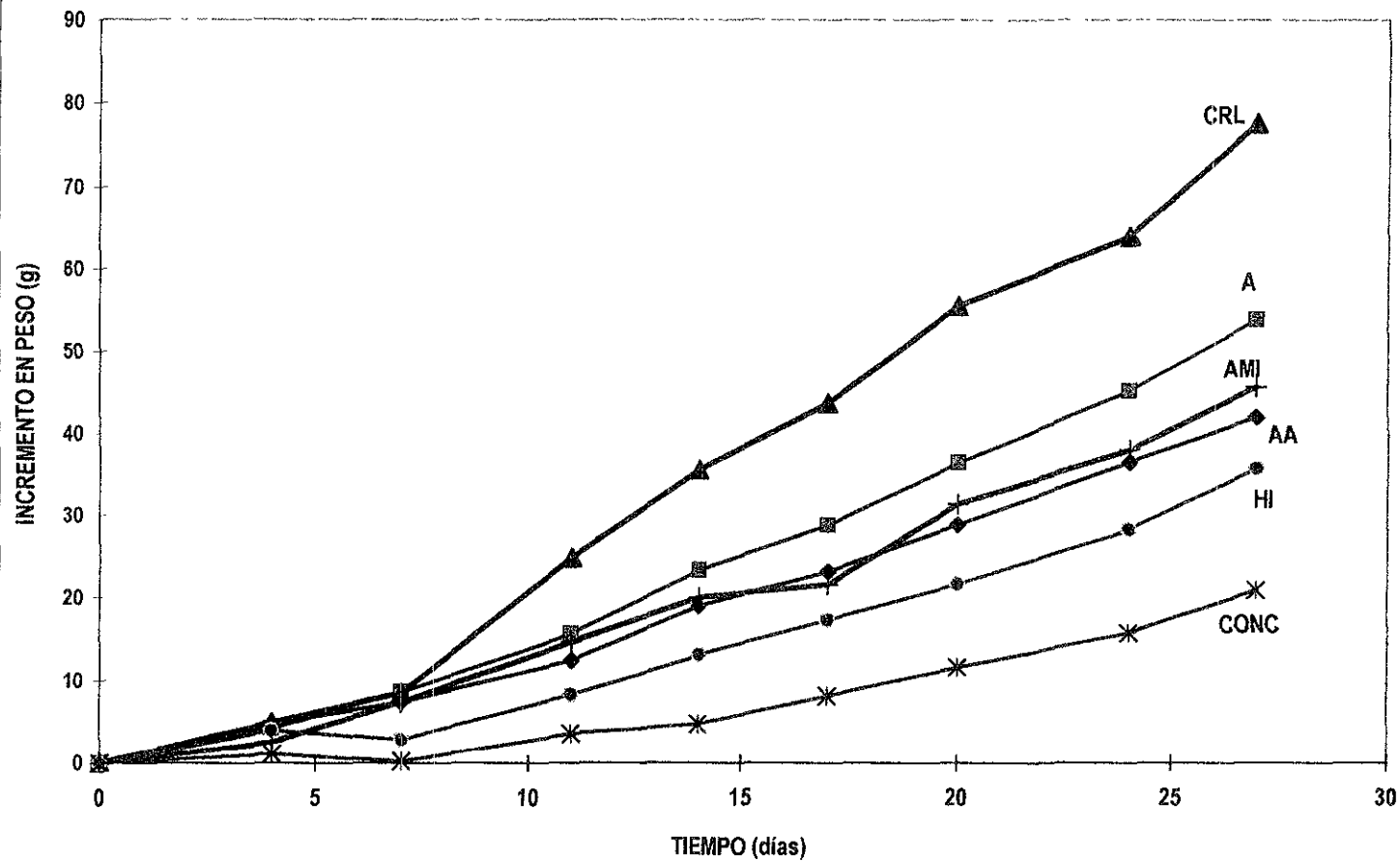


Figura No.9 CURVAS DE CRECIMIENTO DE RATAS DURANTE EL ENSAYO BIOLÓGICO

5.6.3 Resultados de digestibilidad "in vivo"

Los resultados de esta determinación se muestran en la **TABLA No. 19**, a dichos valores se les realizó un análisis estadístico que consistió en el análisis de varianza de una vía (ANOVA), junto con la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan); observándose que existe diferencia significativa entre las dietas de aislado y harina de arroz(AA), harina integral (HI) y concentrado proteínico (CONC), con respecto a la dieta control(CRL); así mismo se observó que la mayor digestibilidad se obtiene con la dieta de aislado proteínico (A), siguiendo la del aislado adicionada con aminoácidos (AMI) y la dieta control, encontrándose que entre estas dietas no existe diferencia significativa. También se observa que la dieta del concentrado presentó la digestibilidad más baja; al igual que la dieta de harina integral sin presentarse diferencia significativa entre ellas.

TABLA No. 19
DIGESTIBILIDAD "IN VIVO" DE LAS DIETAS DE DIFERENTES PREPARADOS DE *C.pepo*

Dieta*	% N en heces	% N en dieta	% Digestibilidad
CRL	3.071±0.277	1.61	^{a, b} 92.91±0.468
HI	3.808±0.374	1.62	^c 90.51±1.393
CONC	4.039±0.278	1.72	^c 89.75±2.040
A	2.840±0.222	1.61	^a 94.14±0.816
AMI	3.021±0.377	1.52	^{a, b} 93.21±0.969
AA	3.087±0.157	1.57	^b 92.51±0.762

(*) Descripción de las siglas usadas.

CRL: Control,

HI: Harina integral

CONC: Concentrado proteínico

A: Aislado proteínico

AMI: Aislado proteínico, suplementado con metionina e isoleucina

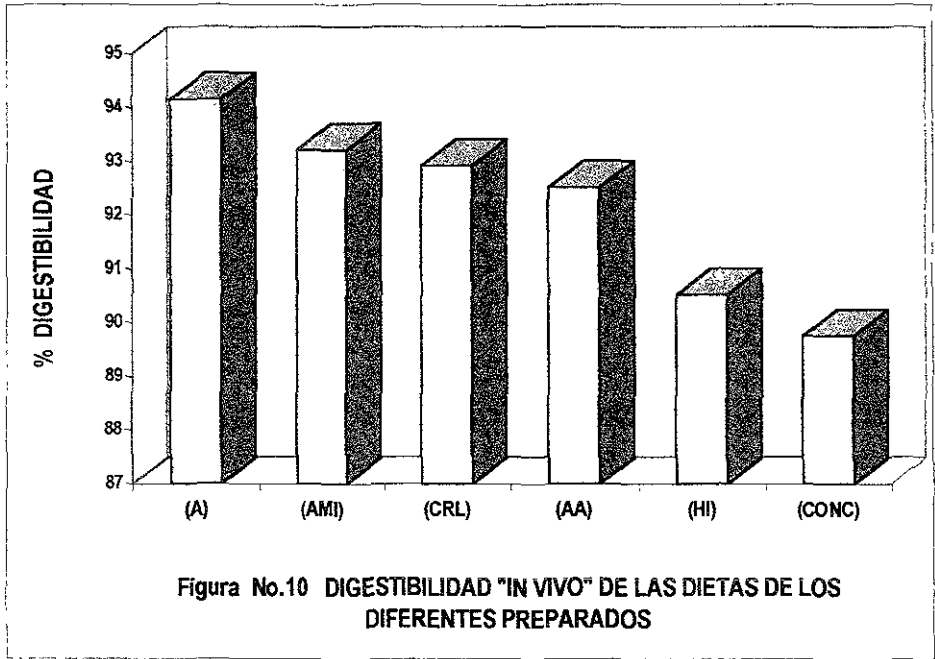
AA: Aislado proteínico, suplementado con harina de arroz

^{a, b, c} Diferente letra indica diferencia significativa ($\alpha=0.05$)

Los anteriores resultados coinciden con los obtenidos en la prueba de digestibilidad "in vitro"; ya que al igual que en el ensayo biológico, la dieta del aislado presenta una mejor digestibilidad. En el caso

de la dieta del concentrado y harina integral, al comparar los valores, se observa que; en la determinación "in vitro" la digestibilidad de la dieta del concentrado, es mayor a la de la harina integral; mientras que en la determinación "in vivo", dicho resultado se invierte. Sin embargo, en ambas determinaciones, estadísticamente no existe diferencia significativa entre la dieta del concentrado y la de harina integral, por lo que ambas se pueden considerar correctas.

En la **Figura No. 10** se presentan los valores de digestibilidad "in vivo" obtenidos en cada una de las dietas empleadas en el ensayo biológico



5.6.4 Resultados de citometría hemática

Considerando que los parámetros hematológicos son valores predictivos del estado de salud de los animales; se les realizó una prueba estadística de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una

prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan) con el fin de conocer si existía diferencia significativa entre los diferentes lotes de animales al inicio del ensayo. Los resultados que se encontraron se muestran en la **TABLA No. 20**; en ella se observa que no existe diferencia significativa entre los lotes, como era de esperarse.

TABLA No. 20
CITOMETRÍA HEMÁTICA DE LOS ANIMALES AL INICIO DEL ENSAYO

Dieta ^a	Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematocrito (%)	MCV ^a (fL)	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
CRL	3.79 $\pm$ 1.75	6.62 $\pm$ 0.77	11.53 $\pm$ 1.22	58.46 $\pm$ 6.53	88.50 $\pm$ 5.80	1089 $\pm$ 161
HI	3.34 $\pm$ 1.70	6.33 $\pm$ 0.71	11.19 $\pm$ 1.01	57.06 $\pm$ 5.11	90.45 $\pm$ 7.44	1140 $\pm$ 115
CONC	3.32 $\pm$ 1.53	6.10 $\pm$ 0.61	10.92 $\pm$ 0.92	55.23 $\pm$ 4.37	90.01 $\pm$ 5.28	1114 $\pm$ 131
A	4.44 $\pm$ 1.98	6.88 $\pm$ 0.91	11.36 $\pm$ 1.04	58.50 $\pm$ 6.12	85.36 $\pm$ 5.01	1012 $\pm$ 132
AMI	3.04 $\pm$ 0.55	6.28 $\pm$ 0.99	11.60 $\pm$ 1.29	58.12 $\pm$ 6.29	91.16 $\pm$ 4.08	1024 $\pm$ 118
AA	4.08 $\pm$ 1.18	6.76 $\pm$ 0.72	11.30 $\pm$ 0.85	59.21 $\pm$ 4.62	88.00 $\pm$ 7.50	930 $\pm$ 145

^a Volumen corpuscular medio

^b Descripción de las siglas usadas: CRL: Control, HI: Harina integral, CONC: Concentrado proteínico, A: Aislado proteínico

AMI: Aislado proteínico, suplementado con metionina e isoleucina

AA: Aislado proteínico, suplementado con harina de arroz

Una vez terminado el ensayo biológico, se procedió a realizar el sangrado ocular de cada uno de los animales empleados para determinar la citometría hemática; cuyos resultados se muestran en la **TABLA No. 21** los cuales, al realizarles el análisis estadístico que consistió en un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan), muestran que los valores de leucocitos, eritrocitos, volumen corpuscular medio (MCV) y plaquetas no presentaron diferencia significativa con respecto a la dieta control (CRL). En cuanto a los valores de hemoglobina y hematocrito se observó diferencia significativa entre la dieta control y la dieta del concentrado proteínico (CONC) en ambos parámetros.

TABLA No. 21

CITOMETRÍA HEMÁTICA DE LOS ANIMALES AL FINAL DEL ENSAYO

Dieta*	Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematocrito (%)	MCV ^a (fL)	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
CRL	6.04 $\pm$ 0.65	8.83 $\pm$ 0.60	16.65 $\pm$ 1.17	47.30 $\pm$ 4.33	53.50 $\pm$ 1.37	1169 $\pm$ 263
HI	6.13 $\pm$ 1.83	8.16 $\pm$ 1.03	14.75 $\pm$ 1.54	42.06 $\pm$ 4.65	51.66 $\pm$ 1.75	1279 $\pm$ 128
CONC	4.56 $\pm$ 1.20	7.60 $\pm$ 0.59	13.55 $\pm$ 1.27	38.38 $\pm$ 3.75	50.16 $\pm$ 1.32	1042 $\pm$ 320
A	5.22 $\pm$ 1.22	8.64 $\pm$ 0.24	15.76 $\pm$ 0.47	44.96 $\pm$ 2.25	52.16 $\pm$ 2.13	1385 $\pm$ 149
AMI	5.82 $\pm$ 2.00	7.94 $\pm$ 0.54	14.71 $\pm$ 0.72	41.80 $\pm$ 2.16	52.83 $\pm$ 1.47	1331 $\pm$ 261
AA	5.17 $\pm$ 1.80	8.29 $\pm$ 0.39	15.10 $\pm$ 0.44	42.30 $\pm$ 2.92	51.00 $\pm$ 1.54	1325 $\pm$ 216
Diferencia Significativa, respecto CRL	-----	-----	CONC	CONC	-----	-----

*Descripción de las siglas usadas: CRL: Control, HI: Hanna integral, CONC: Concentrado proteínico, A: Aislado proteínico
AMI: Aislado proteínico, suplementado con metionina e isoleucina
AA: Aislado proteínico, suplementado con harina de arroz

De los anteriores resultados destaca que la dieta del concentrado proteínico, presenta los valores más bajos en todos los parámetros evaluados. Debido a que los parámetros fundamentales para determinar posible anemia ocasionada por deficiencia de hierro; son los valores de hemoglobina y hematocrito; se puede considerar que los animales alimentados con la dieta del concentrado, presentan dicha deficiencia. Además en éstos animales se observa un indicio claro de anemia microcítica; debido a que los valores de eritrocitos y volumen corpuscular medio se encuentran en niveles menores a los normales. No obstante, se puede observar que la diferencia numérica entre los valores de la dieta del concentrado y el resto de las dietas no es tan amplia, por lo cual, se puede considerar que el grado de desnutrición que presentan los animales alimentados con la dieta del concentrado es pequeño y que puede llegar a corregirse con una adecuada suplementación férrica.

En las Figuras No. 11 y 12 se muestran gráficamente los valores de hemoglobina y hematocrito encontrados en los animales de cada una de las dietas evaluadas

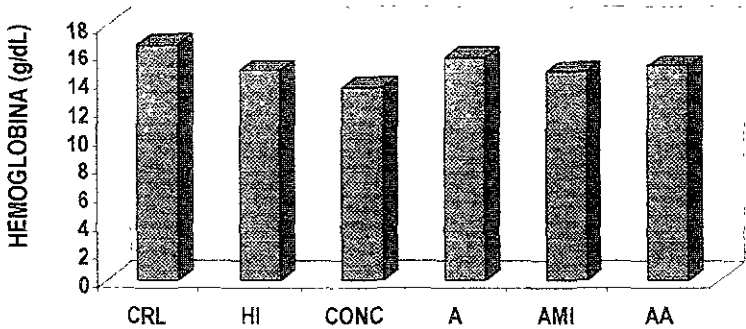


FIGURA No. 11 VALORES DE HEMOGLOBINA DE LOS ANIMALES AL FINAL DEL ENSAYO

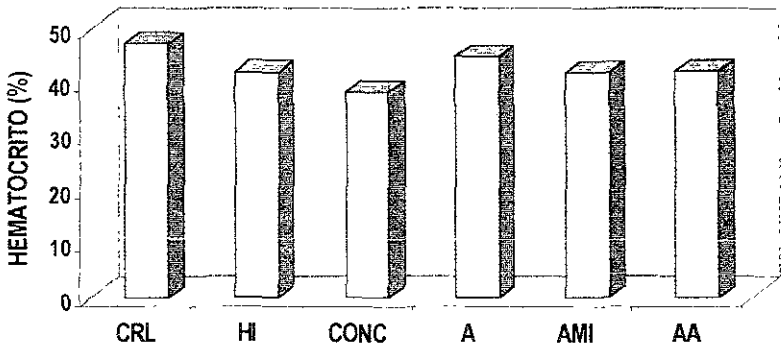


FIGURA No. 12 VALORES DE HEMATOCRITO DE LOS ANIMALES AL FINAL DEL ENSAYO

ESTADÍSTICA Y CALIDAD
DE LA PRODUCCIÓN

5.6.5 Relación porcentual de órganos

Una vez terminado el ensayo biológico, se procedió a realizar la necropsia a los animales empleados con el fin de observar posibles anomalías en los órganos. En la **TABLA No. 22** se presentan los promedios de los pesos porcentuales de intestino, hígado, pulmón y riñón; siendo el hígado, el órgano de importancia relevante; ya que es en éste donde comúnmente se muestran signos de toxicidad.

TABLA No. 22

**RELACIÓN PORCENTUAL DE PESOS DE ÓRGANOS Y PESO CORPORAL DE RATAS
EMPLEADAS EN EL ENSAYO BIOLÓGICO**

Dieta ^a	Hígado (%)	Intestino (%)	Pulmón (%)	Riñón (%)
CRL	3.97±1.42	4.63±1.37	1.22±0.32	1.07±0.31
HI	3.80±0.54	5.24±0.76	1.34±0.23	1.14±0.17
CONC	3.68±0.59	5.42±0.80	1.69±0.27*	1.35±0.17
A	3.77±0.32	4.41±0.56	1.43±0.17	1.23±0.17
AMI	3.56±0.33	4.69±0.47	1.46±0.35	1.30±0.19
AA	3.89±0.32	4.66±0.49	1.43±0.28	1.41±0.28*

^a Muestra diferencia significativa con respecto al control(CRL)

* Descripción de las siglas usadas: CRL: Control, HI: Harina integral, CONC: Concentrado proteínico, A: Aislado proteínico
AMI: Aislado proteínico, suplementado con metionina e isoleucina
AA: Aislado proteínico, suplementado con hanna de arroz

A los promedios de los pesos porcentuales de órganos se les realizó un análisis estadístico que consistió en el análisis de varianza de una vía (ANOVA) junto con la prueba de rangos múltiples (Prueba de Duncan), y los resultados muestran que no se presentó diferencia significativa con respecto al control; con excepción nuevamente del concentrado proteínico (CONC); cuyo peso porcentual del pulmón fue mayor. Lo cual puede atribuirse a que; para el caso de los animales

alimentados con ésta dieta, los valores de eritrocitos están por debajo de los normales y como medida de compensación, el pulmón tiende a aumentar su tamaño.

La relación porcentual de riñón indicó diferencia significativa entre la dieta del aislado con harina de arroz (AA), contra el control (CRL). Si bien, estadísticamente se observa diferencia significativa; se puede considerar que en los resultados reales no existe tal, debido a que los valores se encuentran dentro de los considerados normales. Aunque existe la posibilidad, de que los valores ligeramente elevados del peso porcentual del riñón en la dieta de harina y arroz (AA) sean debidos a que los animales alimentados con esta dieta hallan presentado un mayor movimiento de líquido corporal debido a algún proceso de deshidratación. Sin embargo, como ya se mencionó, no se puede considerar como la evidencia de alguna anomalía o signos de toxicidad.

Respecto a la apariencia de los órganos, no se observó ninguna morfolopatología; sólo en el caso de la dieta de aislado y harina de arroz (AA), se observó que el intestino presentaba flatulencia.

5.7 Resultados de propiedades Fisicoquímicas

Los resultados obtenidos de la evaluación de algunas de las propiedades fisicoquímicas de los preparados proteínicos de la almendra de calabaza se muestran en la **TABLA No. 23**. Para dicha evaluación se empleó como referencia aislado y concentrado de soya, con el objetivo de poder comparar con ésta a los diferentes preparados. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. En cuanto a la evaluación de humectación se observa que concentrado y aislado proteínico de la almendra de calabaza se comportan de manera similar al concentrado de soya, presentando una capacidad adecuada a la humectación; siendo el aislado de soya la muestra que tiene mayor capacidad a humectarse dentro de la escala de evaluación según la metodología propuesta por Regenstern, 1985.

Los valores de capacidad de retención de agua (CRA) indicaron que tanto el aislado(2.35) y concentrado (2.29) de la almendra de calabaza tienen valores similares a los del concentrado de soya (2.11), siendo el aislado de soya la muestra capaz de retener más gramos de agua por un gramo de muestra (3.95). Dentro de éstos valores se observa que la CRA mejora en los aislados tanto de soya como de almendra de calabaza.

La determinación de pH encontró que todas las muestras tienen un valor neutro, excepto el aislado proteínico de almendra de calabaza; cuyo pH fue de 4.3. Esto pudo deberse a que en la purificación de la fracción proteínica es necesario precipitar hasta su punto isoelectrico (pH de 5).

La evaluación de volúmenes de sedimentación, encontró que durante los primeros 15 minutos no se observa volumen de sedimentación en los preparados de almendra de calabaza, y a los 30 y 60 minutos, sus volúmenes de sedimentación son menores a los que presentan los preparados de soya; casi la mitad en el concentrado y la tercera parte en el aislado. Considerando que valores de F cercanos a la unidad conllevan a una mejor apariencia del producto o suspensión; se puede afirmar que a pesar que, los valores obtenidos en aislado y concentrado de almendra de calabaza son pequeños, presentan una relativa estabilidad; ya que, comparados con los preparados de soya, éstos no se encuentran con valores muy alejados entre sí.

En el caso de la viscosidad, los valores obtenidos se pueden considerar casi insignificantes, debido a que se registraron 3 Cp para todas las muestras a 21°C; esto fue debido a que la cantidad de muestra para realizar esta determinación estuvo limitada, ya que se emplearon soluciones al 1% de proteína, y recordando que la viscosidad aumenta conforme aumenta el contenido de proteína en las soluciones, se justifican los valores obtenidos; sin embargo considerando que tanto los preparados de soya, como los de la almendra de calabaza registraron los mismos valores, se puede asegurar que es posible que los preparados de la almendra de calabaza presenten el mismo comportamiento

de viscosidad, en soluciones con igual contenido de proteína, a 21°C que el que presentan los preparados de soya.

TABLA No. 23

**ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PREPARADOS PROTEÍNICOS DE LA
ALMENDRA DE CALABAZA**

Muestra	Humectación	CRA ^a	pH	F ^b (15,30,60 min)			Viscosidad (Cp, 21°C)
Aislado de soya (88% proteína)	Buena	3.95	7.3	0.06	0.11	0.15	3
Concentrado de soya (46.5% proteína)	Adecuada	2.11	7.1	0.03	0.07	0.08	3
Aislado de almendra (87.84% proteína)	Adecuada	2.35	4.3	---	0.03	0.04	3
Concentrado almendra (70.79% proteína)	Adecuada	2.29	7.1	---	0.03	0.05	3

^a Capacidad de retención de agua; expresada en g de agua retenida por 1 g de muestra

^b Volumen de sedimentación $F = V_u(\text{volumen del sedimento}) / V_0(\text{volumen total de la suspensión})$

6. CONCLUSIONES

- Los parámetros físicos evaluados en la semilla y la almendra empleada para este estudio, indican semejanza con resultados reportados en trabajos anteriores; verificando que se trata de la misma especie; además fue posible confirmar su alto contenido de proteína (39.32%).
- Se obtuvo con relativa facilidad un concentrado y un aislado proteínico con un 79 y 88% de proteína, respectivamente y según la determinación de proteína verdadera; la almendra de calabaza contiene un 78% de nitrógeno proteínico y el concentrado un 92%
- De acuerdo al perfil de aminoácidos y a la calificación química; los aminoácidos limitantes en la almendra de calabaza y en sus preparados son la isoleucina y los azufrados.
- La curva de crecimiento obtenida del ensayo biológico, indica que con la dieta de aislado proteínico se obtiene el mayor incremento en peso. El menor incremento en peso se observa con la dieta de concentrado proteínico; y por lo tanto la que presenta la menor relación de eficiencia proteínica; lo que es confirmado por los resultados de digestibilidad, donde el aislado es el que presentó el mejor índice biológico (94%).
- La relación de eficiencia proteínica indica que existe diferencia significativa entre todas las dietas evaluadas con respecto al control (CRL); como era de esperarse debido a que se trata de una proteína de origen vegetal. También se observó que la dieta del concentrado presenta el valor más bajo de PER (1.19), lo cual concuerda con el resto de los parámetros biológicos que fueron evaluados.
- Los estudios de citometría hemática indican que la dieta del concentrado, presenta diferencia significativa con respecto al control en hemoglobina y hematocrito; en esta misma dieta, se observa que los valores de eritrocitos y volumen corpuscular medio son menores a los de las

demás dietas, lo cual puede interpretarse como anemia microcítica en los animales alimentados con la dieta del concentrado proteínico

- La relación porcentual de los diferentes órganos confirma que los diferentes preparados proteínicos de la almendra de calabaza no producen anormalidades ni síntomas aparentes en los animales empleados; a excepción del concentrado que manifiesta hiperplasia del pulmón.
- Las propiedades fisicoquímicas estudiadas en los preparados de la almendra de calabaza indican que son similares a las de los preparados de soya; lo que permite el posible uso potencial de estos preparados en la elaboración de algún alimento

7. BIBLIOGRAFIA

- Adeyemi, F. and Adediran, G. Aminoacids and mineral compositions and functional properties of some oilseeds. *J Agric. Food Chem.* 42, 878-881 (1994).
- Aguirre T. y González S. Caracterización de fórmulas en polvo para niños intolerantes a la lactosa. Tesis. Fac. Química, UNAM, pág.71, México, D.F. (1993).
- AOAC. Official methods of analysis of the association of analytical chemists. Herlich, K. (Editor) Vol. I, pág. 17-18, 40-62, 69-83, Vol II, pág. 1095-1098, Arlington, (1990).
- Ávila, M., Suárez, M. y Velasco, O. Estado nutricional de preescolares de la etnia Tének en el municipio de Aquismón de la huasteca potosina. 1er. Congreso Nacional de Nutrición, pág. 76-80, México, D.F. (1992).
- Badui, S. Química de alimentos. Alhambra Mexicana, pág. 234-238, México, D.F. (1994).
- Bourges, R. Panorama de la alimentación y nutrición en México. Seminario sobre la alimentación en México. Inst. Geografía. UNAM, pág. 27-47, México, D.F. (1984).
- Caraway, F. Stabilized tungstic acid reagent for blood deproteinization. *Chem. Anal.* 47, 44-45 (1958).
- Conca T. Evaluación química y biológica de la grasa cruda y destoxificada de dos semillas de *Erythrina* mexicanas. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.(1995).
- Cravioto, O. R. y Cervantes, M. Estudio sobre proteínas y aminoácidos de alimentos mexicanos. *Ciencia* (1-2):83-88 (1965)
- Cheftel, J.C. Proteínas alimentarias. Ed. Acribia, pág. 49--58, 116-123 Zaragoza, (1989).
- Derelanks, M.J. and Hollinger, M.A. Handbook of toxicology. CRC. Press, pág. 518,519, 530,531,805, Boca Raton, (1995).

- FAO. Utilización de alimentos tropicales: semillas oleaginosas tropicales. Colección Alimentación y Nutrición, No. 47/5, pág. 83-87, Roma, (1990).
- Fennema, O. Química de los alimentos. Ed. Acribia, pág. 315-317, 322, 358-370 Zaragoza, (1993).
- Gay, W. Methods of animal experimentation. Vol. I. Academic Press, pág. 104, 109-111, N.Y. (1965).
- Gómez, L.F. Recursos alimentarios potenciales de zonas áridas. Seminario sobre la alimentación en México. Inst. Geografía, UNAM, pág. 103-113, México, D.F. (1984).
- Hendersón, C., Scheerens, J. and Berry, J. Antinutritional factors in *Cucurbita* seed meals. J. Agric. Food. Chem. 34, 434-436 (1986).
- INEGI. Estadísticas del sector salud y seguridad social. Cuaderno No.16, pág. 47-52, México, D.F. (2000)
- INEGI. El sector alimentario en México, pág. 227-241, México, D.F. (2000).
- Larrañaga, I. Dietética y dietoterapia. Ed McGraw-Hill, pág. 78-81, Zaragoza, (1997).
- Lee, G.R., Bithell, T.C. Foerster, J. Athens, J. W. and Lukens, J.N. Witrobe. Hematología clínica. 9ª. ed. Ed. Inter Americana, Vol. 3, pág. 107-112, Buenos Aires, (1979).
- Lin, M. Humbert, E. and Sosulski, F. Certain functional properties of sunflower meal products. J. Foods Sci. 39, 368-370 (1974).
- Lucas, B. and Sotelo, A. Aminoacids determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hidrolisis methods. Anal. Biochem. 123, 349-356, (1982)
- Lucas, B. and Sotelo, A. Effect of different alkalies, temperature and hidrolisis times on tryptophan determination of pure proteins. Anal Biochem. 109, 192-197 (1980)
- Mansour, E. Dworschák, E., Lugasi, A. Barna, E. and Gergely, A. Nutritive value of pumpkin (*Cucurbita pepo* Kakai 35) seed products. J. Sci. Food. Agric. 61, 73-78 (1993)
- Mc. Donald, P. Nutrición animal. 3ª. ed. Ed. Acribia, pág. 200-204, 259-263, Zaragoza, (1988).

- Maroto, J. V. Horticultura herbácea especial. Ed. Mundi-Prensa, pág. 457-465, Zaragoza, (1992).
- Martínez, H. Functionality of vegetable proteins other than soy. J. Am Oil Chemists' Soc. 56; 280-284 (1979).
- Messiaen. Las hortalizas. Técnicas agrícolas y producciones tropicales Ed. Blume, pág. 225-231, México, D.F. (1979).
- Mitchell, S., Helen, R, Nutrición y dieta. 16ª ed. Ed. Interamericana, pág. 36-41, México, D.F. (1978).
- Mora, J. F., Soporte nutricional especial. Ed. Médica Panamericana, pág. 35-40, 56-58, Bogotá, Colombia, (1992).
- Moreno E. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología, UNAM, pág. 250-252, México, D.F. (1984).
- Naisbitt, G., Lu, M-R., Gray, W. and Vernon, L. Properties of a small peptide from pumpkin seeds. Plant Physiol. 88, 770-773 (1988).
- Narayana, K. and Narasinga, R. Effect of partial proteolysis on the functional properties of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) flour. J. Food Sci. 49, 944-947 (1984).
- Ostoa, M. Determinación de factores tóxicos y antinutricionales en algunas semillas crudas y procesadas consumidas en la etnia Tenek del municipio de Aquismón, S.L.P. Tesis. Fac. Química, UNAM, pág. 97 México, D.F. (1997)
- Paredes Calderon M. Evaluación de la toxicidad aguda y subaguda de la fracción proteínica de la almendra de calabaza (*Cucurbita pepo*). Tesis, Fac Química, UNAM. pág. 46-49, 73-75, 80-82, México, D.F. (2001).
- Raymond, A.T. Producción de semillas de plantas hortícolas. Ed. Mundi- Prensa, pág. 185-191, Zaragoza, (1989).

- Regenstein, J.M. and Regenstein, C.E. Food protein chemistry. An introduction for foods scientist. Academic Press Inc. Cap. 27, pág. 289,290, London, (1984).
- Remington. (Editor). Farmacia. 17ª. ed. Ed. Panamericana. Tomo 1, pág. 441,442, Buenos Aires, (1992).
- Robinson, S. D. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Ed. Acribia, pág. 109-116, 120-125, 128-134 Zaragoza, (1991)
- Ruiz, A. Fundamentos de hematología. 2ª. ed. Ed. Medica Panamericana, pág. 31-43, México, D.F. (1998).
- Sharma, P., Lal, P., Madaan, T. And Chatterjee, S. Studies on the nutritional quality of some cucurbit kernel proteins. J. Sci. Food Agric. 37, 418-420 (1986).
- Serna, S. Química, almacenamiento e industrialización de cereales. Ed. A.G.T., pág. 80-82, México, D.F.(1997).
- Sunday, G. and Dickson, B. Proximate composition and functional properties of raw and processed full-fat pumpkin (*Telfairia occidentalis*) seed flour J. Sci. Food Chem. 59, 321-325 (1992).
- UNAM. Practicas de laboratorio de nutrición. "Determinación de triptofano". Facultad de Química, México, D.F.(1982).
- Valadez L. A. Producción de Hortalizas. 4ª. ed. Ed. UTHEA, pág. 223-233, México,D.F. (1994).
- Wang, C.R. and Zayas, J.F. Emulsion capacity and emulsion stability of soy proteins compared with corn germ protein flour. J. of Food Science. 57, (3); 726-731 (1992)
- Winton, AL. Análisis de alimentos. Ed. Continental, pág. 64-81, México, D.F.(1967).