



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación nutritiva del grano de frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*) verde, seco, seco refrito y complementados con maíz, consumidos en el municipio de Cuetzalan, Puebla.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

FLORES CORTES GUADALUPE XIMENA

MÉXICO, D.F.

2015





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: M en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
VOCAL: M en C LUCIA CORNEJO BARRERA
SECRETARIO: M en C ARGELIA SANCHEZ CHINCHILLAS
1er. SUPLENTE: M en C JEANTTE ADRIANA AGUILAR NAVARRO
2do. SUPLENTE: Q.A JESUS ANTONIO BEAZ RIVERA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Anexo 1 del Lab. 4C del Departamento de Alimentos y Biotecnología y UNEXA de la Facultad de Química.

Circuito de la investigación Científica s/n, Cd. Universitaria, CP 04510, Delegación Coyoacán, México DF

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Bernardo Lucas Florentino.

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. Jesús Antonio Beaz Rivera.

SUSTENTANTE:

Guadalupe Ximena Flores Cortes.

Índice Temático

	Página
Lista de Abreviaturas.....	i
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Antecedentes.....	4
3.1 Alimentación Mexicana.....	4
3.1.1 Biodisponibilidad.....	4
3.1.2 Digestibilidad.....	5
3.1.3 Calidad nutrimental.....	6
3.1.4 Complementación.....	8
3.1.5 Evaluación de la calidad nutrimental.....	9
3.1.5.1 Digestibilidad <i>in vitro</i>	9
3.1.5.2 Digestibilidad aparente <i>in vivo</i>	10
3.1.5.3 Índice de Conversión Alimentaria.....	10
3.1.5.4 Relación de la Eficiencia Proteica (REP).....	11
3.1.5.5 Relación Neta de Proteína (RNP).....	12
3.1.5.6 Porcentaje de Energía Digerible (%ED).....	13
3.2 Uso de ratas como animales de experimentación.....	13
3.2.1 Criterios de selección de especies.....	14
3.2.2 Bienestar animal.....	15
3.2.3 Enriquecimiento ambiental.....	16
3.2.4 Obtención del incremento en peso de la DLN	16
3.3 Leguminosas.....	16
3.3.1 Frijol (Genero <i>Phaseolus</i>).....	18
3.3.2 Frijol gordo (Genero <i>Phaseolus polyanthus</i>).....	19
3.4 Cereales.....	19
3.4.1 Maíz (harina de maíz nixtamalizado).....	20
4. Metodología.....	22
4.1 Información de la muestra biológica.....	24
4.2 Tratamiento térmico.....	24
4.3 Preparación de frijol seco cocido refrito	25

4.4	Análisis bromatológico	25
4.4.1	Humedad.....	25
4.4.2	Cenizas	26
4.4.3	Grasa.....	28
4.4.4	Fibra cruda.....	29
4.4.5	Proteína cruda (Nitrógeno total para el método micro Kjendahl).....	31
4.4.6	Hidratos de Carbono.....	34
4.5	Densidad energética.....	34
4.6	Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>	37
4.7	Formulación y elaboración de las dietas.....	39
4.8	Ensayo biológico.....	41
4.8.1	Relación Neta de la Proteínica (RNP)	41
4.8.2	Relación de la eficiencia Proteínica (REP).....	43
4.9	Evaluación del índice de Conversión Alimenticia (ICA)	44
4.10	Evaluación Digestibilidad aparente (Da)	44
4.11	Evaluación del porcentaje de Energía Digerible (%ED)	45
4.12	Análisis estadístico.....	46
5.	Resultados y Discusión.....	47
5.1	Análisis químico proximal	47
5.2	Digestibilidad <i>in vitro</i>	49
5.3	Preparación de la dieta.....	50
5.4	Ensayo Biológico.....	51
5.4.1	Alimento consumido.....	51
5.4.2	Curvas de crecimiento.....	52
5.4.3	Índice de Conversión alimenticia (ICA).....	54
5.4.4	Relación Neta Proteica (RNP).....	55
5.4.5	Relación de eficiencia Proteica (REP).....	56
5.4.6	Digestibilidad aparente (Da).....	58
5.4.7	Energía Digerible (% ED).....	59
5.5	Análisis de correlación.....	60
6.	Conclusiones	63
7.	Bibliografía.....	64

Abreviaturas

AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos de los Estados Unidos de América
CAS	Aislado de caseína de leche de vaca
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado de y Uso de Animales de Laboratorio
Da	Digestibilidad Aparente (<i>in vivo</i>)
FSC	Frijol Seco Cocido
FSC:HMN	Frijol Seco Cocido con Harina de Maíz Nixtamalizado
FSCR	Frijol Seco Cocido Refrito
FSCR:HMN	Frijol Seco Cocido Refrito con Harina de Maíz Nixtamalizado
FVC	Frijol Verde Cocido
FVC:HMN	Frijol Verde Cocido con Harina de Maíz Nixtamalizado
HMN	Harina de Maíz Nixtamalizado
ICA	Índice de Conversión Alimenticia
LCAS	Lotes de animales alimentados con la dieta de referencia de aislado de caseína
LFSC	Lotes de animales alimentados con la dieta de frijol seco cocido
LFSC:HMN	Lotes de animales alimentados con la dieta de frijol seco con Harina de Maíz Nixtamalizado (Relación proteínica de 50:50)
LFSCR	Lotes de animales alimentados con la dieta de frijol seco cocido refrito
LFSCR:HMN	Lotes de animales alimentados con la dieta de frijol seco cocido refrito con Harina de Maíz Nixtamalizado (Relación proteínica de 50:50)
LFVC	Lotes de animales alimentados con la dieta de frijol verde cocido
LFVC:HMN	Lotes de animales alimentados con la dieta de frijol verde cocido con Harina de Maíz Nixtamalizado (Relación proteínica de 50:50)
LHMN	Lotes de animal alimentados con la dieta de Harina de Maíz Nixtamalizado.
RNP	Relación Neta Proteínica
REP	Relación de Eficiencia Proteínica
REP ajustado	Relación de Eficiencia Proteínica relacionado con dieta de caseína (referencia)
Pi	Peso inicial del animal (día cero)
ΔP	Incremento en peso
%ED	Porcentaje de Energía Digerible

1. Introducción

En México, la desnutrición continúa siendo un problema que afecta a las comunidades rurales, asociada a la escasez de los alimentos con buena calidad nutritiva. Dicha calidad de la alimentación depende en ocasiones del equilibrio de los nutrientes que contiene, por lo cual es necesario realizar un balance y complementación de los alimentos a ingerir para lograr un equilibrio para una adecuada nutrición. Las leguminosas y los cereales constituyen un papel importante en la complementación en la base de la alimentación mexicana. Un ejemplo de esto son las dietas carentes de alimentos de origen animal y basadas en alimentos de origen vegetal, las cuales no proporcionan la cantidad suficiente de aminoácidos por lo cual es necesaria la complementación, como es el caso de cereal-leguminosa.

Las leguminosas han sido utilizadas por el hombre debido a su alto contenido de proteína y, en algunos casos, por la adecuada proporción de grasas que presentan las semillas de algunas especies (Nadal, 2004). Las leguminosas se someten a una serie de procesos tecnológicos o culinarios que mejoran su valor nutricional y disminuyen componentes no deseables como son factores tóxicos y antinutrientales (inhibidores enzimáticos, hemaglutininas, saponinas, ácido fítico, entre otros) presentes en estos alimentos crudos. Ahora bien, un tratamiento térmico prolongado hace disminuir el valor nutritivo de la proteína, ya que destruye algunos aminoácidos indispensables como lisina, metionina y triptófano; sin embargo en ocasiones aumenta la disponibilidad de las proteínas. Los métodos de preparación varían notablemente en función de las culturas y las comunidades ya que los hábitos alimentarios están vinculados fuertemente a la tradición y a la cultura de cada población.

Un reflejo de estos hábitos son los cereales que constituyen un papel importante en la base de la alimentación mexicana tomando en cuenta que estos carecen de aminoácidos necesarios y se requiere hacer una complementación con los vegetales, para obtener los aminoácidos semejantes proporcionados en una dieta de origen animal. Al realizar esta complementación se debe tener

combinación adecuada de cereales y leguminosas, para hacer posible así que las proteínas de esos vegetales se complementen mutuamente, mejorando la calidad del conjunto.

Un ejemplo es el maíz que tradicionalmente se nixtamaliza para elaborar tortillas, lo que aumenta su valor nutritivo y biodisponibilidad, al consumirlo con frijol (cereal- leguminosa) da como resultado una complementación de los aminoácidos presentes en cada uno de ellos, mejorando la calidad del conjunto.

Dentro del género *Phaseolus* el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) corresponde al frijol más conocido y consumido en nuestro país. Sin embargo, el frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*) nombre vulgar con el que se le conoce en el municipio de Cuetzalan, Puebla poco conocido en el resto del país, pero de importancia en la alimentación de esta población, donde se consume comúnmente en forma verde o fresca (cocidos en olla de barro durante seis horas). Cuando existe sobre producción este se seca y almacena, y se prepara de la misma manera que fresco, o bien frito. Se considera que existe diferencia entre las dos presentaciones, debido a que existe mayor disponibilidad entre el frijol verde y frijol seco.

Debido a que existe poca información científica sobre el aspecto nutritivo del frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*) en este estudio se evaluó la calidad proteínica, de las diferentes formas de consumo (verde, seco y seco refrito), así como la suplementación de los mismos con maíz nixtamalizado (simulando el consumo de tortilla), en términos de los siguientes parámetros de evaluación nutricional: 1. Índice de Conversión Alimenticia (ICA) 2. Relación Neta Proteínica (RNP) 3. Relación de Eficiencia Proteínica (REP) 4. Digestibilidad Aparente *in vivo* (Da) 5. Porcentaje de Energía Digerible (%ED), con la finalidad de tener elementos experimentales sobre el aspecto nutritivo de este frijol y evaluarla su influencia como alimento de consumo para esta región del país.

2. Objetivos

Objetivo general

❖ Determinar la calidad nutrimental proteínico-energética a través de ensayos biológicos como RNP y REP, del grano de frijol gordo (***Phaseolus polyanthus***) verde, seco cocido y seco refrito; así como su complementación con harina de maíz nixtamalizada, con la finalidad de observar el efecto sinérgico en la calidad nutrimental de ambas fuentes de proteína. Adicionalmente, determinar si existe correlación entre el Da y REP y la correlación entre la digestibilidad ***in vitro*** con el método ***in vivo***.

Objetivos particulares

- ❖ Realizar el análisis bromatológico y la digestibilidad ***in vitro*** del frijol seco cocido refrito, así como de la harina de maíz nixtamalizado.
- ❖ Realizar el ensayo biológico con animales de laboratorio, bajo los protocolos y condiciones establecidas con la finalidad de obtener los índices biológicos que permitan evaluar la calidad proteínico energética del frijol gordo (***Phaseolus polyanthus***) en sus diferentes formas de consumo.
- ❖ Corroborar por medio de un ensayo biológico el efecto sinérgico de la complementación frijol-maíz.
- ❖ Determinar si existe correlación entre el Da y REP del frijol gordo y sus diferentes preparaciones.
- ❖ Determinar si existe correlación entre la digestibilidad ***in vitro*** y digestibilidad ***in vivo*** del frijol gordo y sus diferentes preparaciones.

3. Antecedentes

3.1 *Alimentación mexicana*

La calidad de los alimentos puede considerarse como una característica compleja de los mismos que determina su valor o aceptabilidad para el consumidor. Las características de calidad incluyen: el valor nutricional, las propiedades sensoriales como el aspecto, el color, la textura y el gusto, y la inocuidad. Los precios de los alimentos y el acceso económico a una alimentación adecuada constituyen en la actualidad temas cotidianos y de interés general en la población mexicana.

Las condiciones alimentarias han variado a través del tiempo y los grupos humanos se han adaptado a ellas, aprendiendo y creando conocimientos, pautas, creencias, reglas morales, arte, leyes y costumbres que en conjunto forman un todo complejo que se conoce como cultura. Los sistemas alimentarios están constituidos por regímenes que los propios seres humanos generan a partir de combinaciones necesarias para satisfacer sus requerimientos alimenticios. El alimento es una de las necesidades de los seres vivos, de importancia vital, por lo cual es necesario conocer las tendencias respecto a alimentación en cualquier sociedad, por lo que se debe tener una visión más completa de alimentación, ubicación geográfica, dotación de servicios y costumbres arraigadas. (García, U 2012).

3.1.1 *Biodisponibilidad*

Actualmente se entiende por biodisponibilidad “la fracción de un nutrimento ingerido que se utiliza para funciones metabólicas normales o almacenamiento”, y se aplica fundamentalmente a vitaminas, nutrimentos inorgánicos y aminoácidos. Esta definición tiene en cuenta que uno de los determinantes de la biodisponibilidad es la proporción que se absorbe en el tracto gastrointestinal, es decir, el nutrimento ingerido debe transformarse en una forma absorbible y atravesar eficazmente la barrera intestinal, y ser transportado a los lugares de acción o a sus reservorios corporales (Martínez, 2006)

Para el caso particular de las proteínas, cuando se encuentran en estado nativo en ocasiones no es posible obtener la disponibilidad de todos sus aminoácidos. Una

consecuencia positiva de someterlas a un tratamiento térmico es que se produce un desdoblamiento de esta dejando expuestos algunos aminoácidos que están ocultos en su estructura nativa, lo que conlleva a un aumento en la biodisponibilidad y por lo tanto un aumento en el valor nutricional, siempre y cuando no sean un tratamiento térmico severo (Mendoza, 2010).

Las proteínas de origen vegetal carecen de la cantidad adecuada de uno o más aminoácidos indispensables, y en algunos casos son más difíciles de digerir debido a la presencia de otros componentes (Martínez, 2006).

Por último, las interferencias metabólicas tienen su importancia ya que las proteínas alimentarias están acompañadas de otros componentes que pueden afectar su disponibilidad, esta última afectando el desarrollo de los ensayos. Entre estos componentes se encuentran alcaloides, fitoestrógenos, bociógenos, hemaglutininas, entre otros (Gilani, *et al*, 2005).

3.1.2 *Digestibilidad*

El valor nutricional de los alimentos está en función de la capacidad de proveer energía y nutrientes necesarios y la respuesta del animal al alimento es dependiente de la compleja interacción de la composición de la dieta, su preparación y su valor nutritivo. La calidad de los alimentos es indudablemente variable dependiendo de sus características físicas, las cuales son independientes de su composición química. Los factores como densidad energética, tamaño de la partícula, entre otras; influyen los efectos fisiológicos de la digestión. La digestibilidad proteínica es uno de los parámetros utilizados para medir el valor nutricional debido a que no basta que las proteínas se encuentren en altos porcentajes en el alimento si no que debe ser digerible para que pueda ser asimilada y, por consecuencia, aprovechada por el organismo que lo ingiere. Los aminoácidos presentes en las proteínas no están siempre disponibles en su totalidad, debido a que la digestión y absorción de los aminoácidos puede ser incompleta. Las proteínas de origen animal son altamente asimilables ya que no hay factores que condicionen su adecuada absorción, mientras que las de origen

vegetal lo son en menor proporción, estas últimas solo son aprovechadas entre un 60 a 70 por ciento , en parte debido a algunos factores antinutricionales pero además a que la digestibilidad de las proteínas de los alimentos está asociada con su contenido de fibra que actúa como una barrera enzimática, y aumenta la velocidad del paso por el intestino por lo que disminuye el tiempo de absorción, lo que aumenta la excreción de nitrógeno, y reduce por consiguiente la digestibilidad de la proteína (Fox, 1997).

3.1.3 *Calidad nutrimental*

La limitación en el aporte de energía y de proteína conduce a un retraso en el crecimiento. Un concepto importante en nutrición es la calidad de la proteína que viene, principalmente, determinada por el perfil y proporción de los aminoácidos indispensable que la componen, aunque pueden intervenir otros factores como la solubilidad y el grado de glicosilación. La calidad nutricional de una proteína (o una fuente proteínica) se define entonces como la capacidad de esa fuente proteínica para cubrir los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos de un determinado individuo. En otras palabras, la calidad proteínica se refiere a la medida en que los aminoácidos de la dieta pueden utilizarse para la síntesis proteínica. (Moughan, 2005).

Las proteínas son el principal constituyente de todos los sistemas alimentarios, los cuales están estructurados por enlaces peptídicos, y éstos a su vez están constituidos por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre. Se ha establecido que las proteínas son un componente importante de la dieta ya que a través de las proteínas el organismo obtiene los aminoácidos requeridos, sin embargo su valor nutritivo está determinado por la cantidad y proporción de los aminoácidos que la componen (Coulter, 1996).

Lo interesante de la composición química del alimento es la funcionalidad de un compuesto químico que otorga más de una propiedad al alimento. (Mendoza, 2010).

Los aminoácidos se han clasificado, basándose en la posibilidad o no de ser sintetizados por el organismo, en aminoácidos dispensables e indispensables; estos últimos no se pueden sintetizar en el organismo humano y por tanto, deben ser aportados, de forma obligatoria, por la dieta para atender a las necesidades corporales.

Las proteínas poseen un papel fundamental en la nutrición, ya que proporcionan nitrógeno y aminoácidos que podrán ser utilizados para la síntesis y otras sustancias nitrogenadas. Se tiene 20 aminoácidos involucrados en la formación de las proteínas de los alimentos de origen vegetales y animal, de los cuales ocho leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, son considerados indispensables para el humano, por lo tanto es importante su consumo en la dieta. El resto de los aminoácidos son denominados no indispensables. (Aguilar, 2009)

La calidad de una proteína puede modificarse por los tratamientos tecnológicos a los que son sometidos los alimentos que la contiene, por la presencia de factores tóxicos y antinutricionales (afectan a la biodisponibilidad de los aminoácidos) (Martínez, 2006).

Las proteínas cuyo contenido de aminoácidos se aproxima al punto óptimo de satisfacción de las necesidades animales son consideradas de alta calidad y aquellas que se alejan a ese punto son catalogadas como proteínas de baja calidad. (Pellet, 1980). La proteína de más alta calidad produce una tasa de crecimiento más rápida, con la cual se evalúan verdaderos factores importantes en una proteína, entre ellos los siguientes:

- ❖ Patrón y abundancia de aminoácidos indispensables
- ❖ Cantidad relativa de aminoácidos indispensables y no indispensables en las dietas
- ❖ Digestibilidad de la proteína al ser ingerida
- ❖ Presencia de factores tóxicos y antinutricionales

3.1.4 *Complementación*

La complementación proteínica, mediante la mezcla de proteínas, permite mejorar la proporción de los aminoácidos en particular de los indispensables, y por tanto la calidad de esa mezcla proteínica. (Aguilar, 2009).

Las leguminosas se han empleado en la alimentación, desde el inicio de la humanidad, por su adecuado valor nutricional y a sus diversas preparaciones culinarias y su fácil conservación. La proteína de las leguminosas, aunque contiene la mayoría de los aminoácidos indispensables no es de alta calidad por su déficit en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), en cambio, los granos de cereal son ricos en estos aminoácidos. A su vez, la proteína de leguminosas contiene niveles suficientes de lisina, aminoácido indispensable escaso en la mayoría de los cereales. Durante siglos, en diversas partes del mundo, empíricamente se acostumbra el uso de cereales y leguminosas en la dieta, dando como resultado un balance adecuado de aminoácidos.

El punto de partida de la complementación proteínica es el conocimiento de la composición en aminoácidos indispensables y su digestibilidad. Así, se han propuesto que las mezclas más adecuadas son cereales y leguminosas, cereales y lácteos, semillas -frutos secos y leguminosos, aunque otro tipo de mezclas, también mejoran la calidad de la proteína, lo hacen en menor medida que las anteriores.

Este concepto se utiliza para el diseño de dietas o alimentos en los que se mezclan distintas fuentes proteínicas con objeto de mejorar la calidad proteínica. Así, las leguminosas tienen como aminoácido limitante la metionina y algunas el triptófano; los cereales la lisina, triptófano. Al mezclar cereales y leguminosas mejora una de las limitaciones de cada uno. Dado que en la práctica la población mexicana mezcla maíz con frijol considerándose como una base para la alimentación (Blanco, 1991).

3.1.5 *Evaluación de la calidad nutrimental*

Existen diversos métodos para la evaluación proteínica de un alimento, los cuales se han clasificado en métodos químicos los cuales incluyen el cómputo químico, aminograma, IAAE (índice de aminoácidos indispensables), y lisina disponible.

Los métodos biológicos buscan obtener el contenido de disponibilidad de los aminoácidos indispensables, lo cual se determina por medio de bioensayos y son hasta el momento los métodos más confiables, especialmente en el estudio de las funciones de la nutrición, debido a que se basan en la determinación del crecimiento o la retención de nitrógeno en función del consumo de proteína, en donde la rata es el animal experimental más utilizado (Flores, 2010).

3.1.5.1 *Digestibilidad in vitro*

Los procedimientos *in vitro* se han desarrollado para remplazar a los procedimientos *in vivo*, simulando las condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo en el organismo al someter a las proteínas a una digestión artificial mediante el uso de enzimas proteolíticas para estimar la biodisponibilidad de las proteínas sin recurrir a ensayos biológicos. El inconveniente de la digestibilidad *in vitro* es que aunque este tipo de métodos son más precisos y reproducibles, pueden dar resultados inexactos debido a factores tóxicos o antinutricionales, y en cambio los ensayos *in vivo* son más confiables. La prueba tiene su fundamento en que, al llevar a cabo la digestión de la proteína por proteólisis, se liberan al medio H^+ (por la ruptura del enlace peptídico), disminuyendo así el pH. Asumiendo una correlación entre la liberación de ácido y la digestibilidad de la proteína, ésta última puede evaluarse por el registro de la disminución del pH, mientras más bajo sea el pH más digerible será la proteína (Fox, 1997).

3.1.5.2 Digestibilidad aparente *in vivo*.

La digestibilidad *in vivo* en ratas es un método ampliamente utilizado para determinar la calidad de los alimentos de uso humano. En general, los valores de digestibilidad obtenidos son aparentes, ya que normalmente no se hacen mediciones ni correcciones de los aportes metabólicos y endógenos como enzimas, hormonas, metabolitos y células de descarnación. En este sentido la digestibilidad es una estimación indirecta de la absorción de los aminoácidos, resultado de las funciones del proceso digestivo. En términos generales la digestibilidad aparente de un alimento se define con más exactitud como la proporción de aminoácidos que no es excretado en las heces, y que se supone, por lo tanto, que ha sido absorbido (Buraczewska. et. al., 1999).

Hay dos métodos posibles: el **método de recolección total** consiste en la recolección cuantitativa de las heces emitidas que corresponden a uno o muchos alimentos, y el **método con indicador** que ha sido desarrollado para obviar los problemas de la recolección cuantitativa usando un marcador inerte indigerible; el marcador más frecuente usado es el óxido crómico que es incorporado al alimento y luego analizado en él y en las heces. El método de recolección total presenta como ventajas es que puede ser usado para evaluar dietas y piensos, cuantificando los nutrimentos aportados por la dieta y excretados en las heces, y por diferencia obtener el porcentaje de nutrimento asimilado por el organismo (Manríquez ,2014)

3.1.5.3 Índice de Conversión Alimenticia (ICA)

Para comparar diferentes dietas utilizadas en el engorde de animales de granjas, se calcula el ICA para cada lote de animales. El ICA indica la eficiencia de utilización del alimento alcanzada por el animal de estudio durante un período dado de su ciclo de vida. Es decir el ICA considera la cantidad que el animal de estudio requiere de ese alimento para aumentar 1 g de peso corporal. De acuerdo con esto un valor menor, de ICA significa un uso más eficiente del alimento (Tolentino, 2008).

3.1.5.4 Relación de la Eficiencia Proteica (**REP**)

Existen dos grandes categorías de ensayos biológicos para evaluar la calidad de una proteína, aquellas que se basan en el balance de crecimiento corporal de los animales y las que se fundamentan en el balance de nitrógeno (nitrógeno absorbido o retenido). (Adrian, *et al.*; 2000). Los bioensayos determinan la biodisponibilidad de las proteínas alimentarias y son hasta el momento los métodos más confiables (Aguilar, 2009).

En 1919 Osborne, Mendel, McCollum y Davis introdujeron el concepto de Protein Efficiency Ratio (PER), que se traduce como Relación de Eficiencia Proteínica (REP), el cual ha sido varias veces modificado y constituye el procedimiento más utilizado para la evaluación de la calidad nutritiva de una proteína en el área de la ciencia de los alimentos, y en 1975 fue adoptado por la AOAC como método oficial. Osborne, Mendel y Ferry observaron que las ratas jóvenes alimentadas con ciertas proteínas deficientes en aminoácidos indispensables perdían peso y consumían menos proteína, mientras que las que eran alimentadas con proteínas de mejor calidad aumentaban de peso y su ingesta de proteína era mayor. En un intento de compensar la diferencia en la ingesta de los alimentos, calcularon la ganancia de peso por gramo de proteína consumida. El REP de cualquier proteína depende de la cantidad de proteínas incorporadas a la dieta de prueba que tiene condiciones estandarizadas.

El REP se calcula como el aumento de peso promedio total dividido por el promedio de gramos de proteína consumida. Este método tiene como periodo de experimentación de 21 a 28 días, con el uso de una dieta de referencia y la dieta de prueba.

Una desventaja importante es que las proteínas de baja o mala calidad nutritiva, manifiestan una respuesta muy variable, debido a que exagera la variabilidad intraespecie y con este método es difícil asignar un valor preciso, ya que las proteínas de baja calidad, solo pueden cubrir una parte de las necesidades de mantenimiento de proteína (Boutrif, 2014).

Probablemente la crítica más fuerte hecha al REP es que considera que toda la proteína ingerida es utilizada para el crecimiento y no se toma en cuenta la proteína necesaria para el mantenimiento de los animales en estudio. Otro inconveniente es basado en el crecimiento animal, proteínas de baja o mala calidad manifiestan una respuesta muy variable de acuerdo a las especies, haciendo difícil asignar un valor preciso. Los inconvenientes mencionados pueden solucionarse determinando la cantidad de peso corporal que se perdería si el animal no ingiriera proteína durante el periodo de ensayo, ya que antes de que se genere el incremento de peso corporal, la proteína debe cubrir las necesidades proteínicas de mantenimiento (Aguilar, 2009).

Aunado a lo anterior, si se reduce la ingestión de alimento por el animal, el valor de REP de una proteína será mucho menor (Boutrif, 2014).

3.1.5.5 *Relación Neta de Proteína (RNP)*

Bender y Doell propusieron en 1957 el método biológico de balance corporal de "Net Protein Ratio" (NPR), que se traduce en Relación Neta de la Proteína (RNP) y que elimina casi por completo el efecto no deseable que producen proteínas de baja calidad al realizar el método de PER. En este método se considera que la pérdida de peso de este lote es un indicador de la proteína requerida para el mantenimiento de los lotes de prueba. En donde se incluye un lote de animales al que se le administra una dieta libre de nitrógeno, denominada Dieta Libre de Nitrógeno (DLN) y al lote se le define como grupo metabólico. Este método considera que la pérdida de peso de dicho lote es un indicador de la proteína requerida para el mantenimiento de los lotes de prueba. Es importante considerar que no todos los animales comen en la misma forma, y pueden presentar preferencias marcadas y rechazos notorios al alimento cuando tienen la oportunidad de manifestarlos (Aguilar, 2009).

3.1.5.6 *Porcentaje de Energía Digerible (%ED)*

Una vez que un alimento es consumido y es sometido a los procesos de degradación gastrointestinal, se elimina el residuo en las heces. Si al valor de energía bruta (EB) se le resta la energía contenida en las heces, se obtiene el valor de porcentaje ED que es un mejor indicador de la energía disponible en el animal. Es importante mencionar que EB se define como la energía que desprende un alimento al ser quemado totalmente en una bomba calorimétrica, el cual sirve como parámetro de estimación de energía, pero tiene la desventaja de no indicar la disponibilidad o aprovechamiento de la energía del animal que la ingiere (Aguilar, 2009).

Determinando el calor de combustión de las heces y restando este valor de la EB del alimento, se obtiene el porcentaje ED., este valor se califica como energía digerible aparente porque es la energía fecal que incluye la de productos metabólicos del cuerpo y la del alimento no digerido. La porción metabólica corresponde a los líquidos digestivos y a los residuos de la mucosa intestinal. En sentido estricto, esta pérdida es parte de la demanda de mantenimiento del animal (Gutiérrez, 2009).

3.2 *Uso de ratas como animal de experimentación*

El animal es un reactivo indispensable, pero es necesario elegir con un estricto juicio y situado en condiciones adecuadas para que su respuesta sea confiable, los bioensayos proporcionan, una información real sobre la eficacia de un elemento bioquímico incorporado en una reacción alimentaria compleja; por lo cual la rata es un animal cuya sensibilidad de respuesta a condiciones nutricionales en pocos días es posible pronosticar la calidad de la proteína estudiada (Adrian, et al., 2000).

3.2.1 Criterios de selección de especies

Se debe tener en cuenta que requieren diferentes períodos de aclimatación en el laboratorio, según las especies, y es sumamente importante que los organismos de ensayo se manipulen con cuidado, no sufran daños, se encuentren sanos y sean de edad o tamaño uniformes la selección de organismos para bioensayos debe basarse en:

- ❖ Los objetivos del programa o evaluación.
- ❖ La información disponible sobre los posibles organismos.
- ❖ Las características de las especies.
- ❖ Las instalaciones y equipos de laboratorio.

Sexo de la rata: demostrado que en este tipo de ensayos el sexo es primordial ya que las ratas hembras dan valores máximos de crecimiento diferente a los que dan rata macho con dietas con bajo nivel de proteína; además de que las hembras no presentan la misma ganancia de peso como los machos. En este tipo de ensayos es importante manejar un solo sexo para evitar la variabilidad debida al sexo; por lo cual se elige al macho por las características que presenta al ser alimentado, es decir mayor incremento en peso (Venegas, 2010).

Cepa: La utilización de la cepa también tiene efecto en el tipo de ensayo; las más utilizadas son:

- ❖ Wistar: Tranquila, prolífica y las más difundida.
- ❖ Sprague-Dawley: Crecimiento precoz, más prolífica, cabeza y cola más larga que la anterior.
- ❖ Long – Evans: Más pequeña que las anteriores, caperuza negra sobre cabeza, cuello y hombro.

3.2.2 Bienestar animal

El uso de animales como "reactivo vivo" para investigación, enseñanza o constatación solo se justifica cuando contribuye al desarrollo de conocimientos que beneficien a los seres humanos o a los mismos animales (Jean *et al.*, 2000).

El bienestar animal, puede ser definido como un estado de salud física y mental completas, donde el animal se encuentra en armonía con su ambiente. Por lo cual es necesario satisfacer su fisiología teniendo en cuenta la exención de hambre, sed, de dolor, enfermedad, miedo y angustia en los animales. Por lo anterior es determinante lograr un equilibrio entre el eficiente uso de los animales, de carácter experimental y sus resultados; así como los conceptos éticos que debemos aplicar durante la experimentación, la docencia y el control de medicamentos. Por razones científicas y éticas se debe evitar la repetición innecesaria de investigaciones (Fernández, 2007).

Los investigadores, técnicos académicos, estudiantes y empleados de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, que utilizan animales para investigación científica, pruebas de laboratorio y enseñanza, están obligados a buscar y aplicar vigorosamente métodos, siempre debe seguirse el principio básico resumido en la regla de las "3R's":

1. **Refinamiento.**- El diseño, métodos y técnicas experimentales para minimizar el dolor y estrés de los animales durante su utilización en el laboratorio.
2. **Reducción.**- El número de animales utilizados al mínimo necesario para obtener resultados válidos.
3. **Reemplazo.**- (**S**ustituir) el uso de animales mamíferos por sujetos con sistema nervioso más simple, experimentos *in vitro*, cultivos celulares, modelos inanimados, modelos por computadora, entre otros.

En la Facultad de Química existe el comité denominado Comité Institucional para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio **CICUAL** que establece estatutos de regulación para el uso de animales de experimentación y el presente estudio se sometió al CICUAL a través del protocolo que dicho comité solicita.

3.2.3 *Enriquecimiento ambiental.*

El enriquecimiento ambiental está definido por Beaver (1989) como "elementos adicionales al ambiente de un animal con los cuales puede interactuar." Como regla general, la mayoría de los animales de experimentación son animales sociables y se benefician de la compañía de sus congéneres o del humano. También, la previsibilidad de interacciones mejora generalmente el bienestar del animal, mientras que los agrupamientos frecuentes y la fase de estabilización dan resultados opuestos. Se debe recordar que las experiencias de un animal durante sus fases de desarrollo determinan su comportamiento social. Por lo tanto, las condiciones de alojamiento de un animal en una instalación de crianza tendrán un impacto sobre su bienestar futuro. Se deben dar las mismas consideraciones a las necesidades sociales de los animales usados en la investigación, en la enseñanza o en pruebas, como a los factores ambientales tales como la iluminación, la calefacción, la ventilación y la contención (jaulas). Particularmente en el caso de animales alojados individualmente, la observación diaria provee una forma alternativa de contacto social para el animal, y usualmente facilita las manipulaciones, en el sentido que el animal se acostumbra a la presencia del humano (Ernest, 2014).

3.2.4 *Obtención del incremento en peso de la **DLN***

La DLN refiere a la relación de incremento en peso del animal en observación en 10 días del bioensayo con una dieta libre de nitrógeno. Por lo cual es importante la organización de los resultados experimentales en un tiempo significativo para generar un modelo de correlación para obtener el incremento en peso (ΔP) en cual se tiene que tener considerado el peso inicial promedio del lote de animales utilizados para el bioensayo (Venegas, 2010).

3.3 *Leguminosas*

Las leguminosas han sido utilizadas por el hombre desde la más remota antigüedad, formando parte de la dieta debido, principalmente, a su alto contenido de proteína y, en algunos casos, por la adecuada proporción de grasa que

presentan las semillas de algunas especies. El cultivo de las leguminosas se ha considerado muy importante en México desde hace mucho tiempo (Nadal, 2004).

La familia ***Leguminosae*** se compone de 18 mil especies, de las cuales se aprovechan como alimento humano apenas unas 30, en la mayoría de los casos sus semillas maduras, pero en ocasiones también sus vainas, raíces o frutos. Afortunadamente, muchas leguminosas han podido volverse útiles como alimento cuando se descubrió que sus toxinas pueden neutralizarse en forma simple mediante la cocción, germinación, fermentación y/o remojo; procesos que proveen alimentos comestibles, sanos y libres de materiales tóxicos.

El valor nutrimental de algunos alimentos, como los granos de ciertas leguminosas, es mucho menor del que se podría esperar en relación con su composición química. La presencia de factores antinutrimientales reduce la disponibilidad biológica y la digestibilidad de uno o más nutrimentos. Muchos de estos factores antimetabólicos pueden ser inactivados mediante una adecuada aplicación de diversos tratamientos tecnológicos. Es un hecho ampliamente reconocido que los factores antinutrimientales que inciden o interfieren en la disponibilidad de los nutrimentos, causan un efecto negativo en el crecimiento de los animales.

La concentración de estos factores es muy variable y sus efectos biológicos son distintos según la especie animal, siendo los animales jóvenes más sensibles a ellos (Mendoza, 2010).

En México el frijol tiene gran importancia desde diversos puntos de vista: económico, alimentario, biológico y cultural, y en ocasiones constituye la principal fuente alimenticia en especial como fuente de proteína. El consumo de frijol resulta especialmente valioso como complemento de los cereales en aquellas regiones donde la población tiene limitado el acceso a la proteína de productos animales. Sin embargo, el frijol también contiene factores antinutrimientales y tóxicos tales como inhibidores de tripsina, hemaglutininas, saponinas y ácido fítico entre otros.

Muchos de los cuales son destruidos, al menos en parte, durante los tratamientos térmicos que se le dan en la preparación (Serrano, 2004).

Por todo lo anterior las leguminosas han sido consideradas como la proteína de los pobres, a pesar de ser fuente de proteína deficiente en algunos aminoácidos; sin embargo al hacer combinación con los cereales se obtiene una mejora en el balance de aminoácidos, en particular de los indispensables (Rodríguez, 2009).

3.3.1 Frijol (Genero ***Phaseolus***)

El género ***Phaseolus*** pertenece a la familia ***Leguminosae*** subfamilia ***Papilionoideae***. El número de especies que pertenecen a este género son alrededor de 50 y todas son de origen tropical o subtropical . Dentro de estas las cinco especies más conocidas del género ***Phaseolus*** que el hombre ha domesticado son: frijol común (***Phaseolus vulgaris***), frijol de Lima (***Phaseolus lunatus***), frijol escarlata o ayocote (***Phaseolus coccineus***), frijol teparí (***Phaseolus acutifolios***), y frijol botil (***Phaseolus polyanthus***). Todas estas especies son plantas perennes trepadoras de los árboles y de los arbustos para exponer las hojas al sol (FAO,1990).

El contenido de proteínas en (***Phaseolus vulgaris***), reportado en la literatura oscila entre el 16 y 33%. El mayor porcentaje del contenido total, corresponde a una globulina de reserva, denominada faseolina 40 a 60 por ciento soluble en cloruro de sodio 0.5M. El segundo componente proteínico del frijol 6 al 12 por ciento corresponde a las lectinas (hemaglutinas), consideradas tóxica.

Es importante mencionar que estas últimas proteínas se destruyen por calor en los primeros 15 minutos de cocción, este tiempo varía según el tipo de frijol, condiciones de temperatura y humedad de almacenamiento. El valor nutrimental de las proteínas del frijol, está íntimamente relacionado con el contenido de aminoácidos azufrados: metionina, cisteína y triptófano, que son los aminoácidos limitantes(Rodríguez,2009).

3.3.2 Frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*)

En México las investigaciones sobre el frijol se iniciaron alrededor de 1936-1942 a 1944, los estudios se enfocaron en el fitomejoramiento y resistencia a plagas y enfermedades con la realización de cruces entre *Ph. vulgaris* y *Ph. coccineus* buscando recombinaciones resistentes; En 1957 se iniciaron los estudios sobre infiltración genética entre *Ph. vulgaris* y *Ph. coccineus*, que condujeron en 1959 a la descripción de la subespecie *Ph. coccineus* L. *ssp darwinianus* ; también denominadas *Ph. polyanthus* Greenman (Engleman, 1979; Basurto, 2000).

El cultivo de *Phaseolus polyanthus* es muy antiguo en nuestro país, y el consumo de éste en forma inmadura, parece ser un factor limitante, ya que se infiere que tiene menor digestibilidad comparada con otros frijoles. Se considera que esta especie es la menos evolucionada de las domesticadas, por lo que presenta un mayor potencial de evolución futura, además posee un potencial en agrosilvicultura (fertilización del suelo y evitar la erosión de este entre otros aspectos) (Paredes *et al.*, 2006).

En el municipio de Cuetzalan, Puebla, se cultiva esta especie de frijol (*Phaseolus polyanthus*) conocido como “frijol gordo” por los pobladores de esta región. Este frijol es muy conocido y ampliamente consumido en Cuetzalan; sin embargo es poco conocido fuera de estas comunidades por lo que casi no existe información sobre su aspecto nutritivo. Se consume principalmente en forma seca, pero más comúnmente en forma verde o fresca (Rodríguez, 2009).

3.4 Cereales

El valor nutrimental de los cereales, como el de cualquier alimento, depende tanto de su contenido en principios inmediatos como de la capacidad del animal para transformarlos en nutrimentos. Por lo tanto, hay factores de variación intrínsecos y comunes del valor nutritivo de un alimento para todas las especies, y otros extrínsecos que dependen sólo del animal y que van a ser los responsables de las diferencias en su valor nutritivo entre especies. Los factores intrínsecos son todos los relacionados con la composición química del alimento y la organización de

esos compuestos químicos en estructuras más complejas dentro de las células y tejidos de la planta. Los factores extrínsecos son todos aquellos relacionados con la capacidad de digerir (capacidad enzimática, tiempo de tránsito y presencia de otros compuestos que retarden o inhiban la acción enzimática) y absorber en la pared intestinal los nutrimentos producidos (Cabaño, 1995).

3.4.1 Maíz (*harina de maíz nixtamalizado*).

El maíz indudablemente ha tenido una influencia primordial en el uso global de la tierra, en nuestra dieta y en la calidad de nuestras vidas, por su alto contenido de valor energético, por lo cual se usa como parte fundamental tanto de la alimentación humana como animal. El papel central que el maíz ha desempeñado en la historia de Mesoamérica es indiscutible, poco se habla del proceso de nixtamalización que le confiere un alto valor nutritivo, y que es clave en la elaboración de la tortilla, el principal alimento en la dieta del pueblo mexicano y base de su supervivencia desde hace más de 3500 años (Paredes *et al.*, 2006). México es el principal consumidor de tortilla en el mundo, pues se estima que es consumida por el 94% de la población por lo que el volumen de producción y consumo es cercano a los 12 millones de toneladas de tortillas por año lo que representa un porcentaje importante entre los productos alimenticios comercializados en el país (Verdalet, 2001). Desde hace siglos, el maíz es la base de la alimentación en México debido al consumo de tortilla, la cual es una excelente fuente de calorías por su alto contenido de almidón y al igual, una excelente opción para celíacos.

La calidad nutritiva del maíz está definida en buena medida por la calidad de sus proteínas y ésta, a su vez, la establece el contenido de los llamados aminoácidos indispensables. Desafortunadamente, la tortilla de maíz adolece de una buena calidad proteínica ya que este es deficiente en los aminoácidos esenciales ; Lisina y Triptofano (García, 2012).

Es importante indicar que estos aminoácidos no pueden ser sintetizados por el ser humano, por lo que deben estar presentes en su dieta en cantidades recomendadas por organismos de salud tales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El papel central que el maíz ha desempeñado en la historia de Mesoamérica es indiscutible, sin embargo poco se habla del proceso de nixtamalización, que se inicia con la adición de dos partes de una solución de cal aproximadamente al 1% a una porción de maíz.

Esta preparación se cuece de 50 a 90 minutos, y se deja remojando en el agua de cocción de 14 a 18 horas. Posterior al remojo, el agua de cocción, conocida como nejayote, se retira y el maíz se lava dos o tres veces con agua, sin retirar el pericarpio ni el germen del maíz. Se obtiene así el llamado maíz nixtamalizado o nixtamal, que llega a tener hasta 45% de humedad (Paredes, 2006).

Este proceso le confiere al maíz un alto valor nutrimental y cambios funcionales extraordinarios, y que es clave en la elaboración de la tortilla, el principal alimento en la dieta del pueblo mexicano y base de su supervivencia desde hace más de 3500 años (García, 2012).

La nixtamalización provoca que la estructura que une las células del endospermo, llamada lámina media, y las paredes celulares se degraden y solubilicen parcialmente. La mayoría del germen permanece en el grano durante la nixtamalización, lo que permite que la calidad de la proteína de los productos de la masa no se vea afectada. La relación de eficiencia proteínica, se incrementa por el proceso de nixtamalización y mejora considerablemente en forma global el aporte nutritivo de las proteínas del grano de maíz, debido a que por este proceso se logra la biodisponibilidad de vitaminas, proteínas y aminoácidos tales como lisina y triptófano (Paredes, 2006).

4. Metodología

En la **Figura 1** se presenta el diagrama de trabajo para la primera parte y que corresponde a la preparación del material biológico como se consume y su acondicionamiento para obtenerlo en forma de harina.

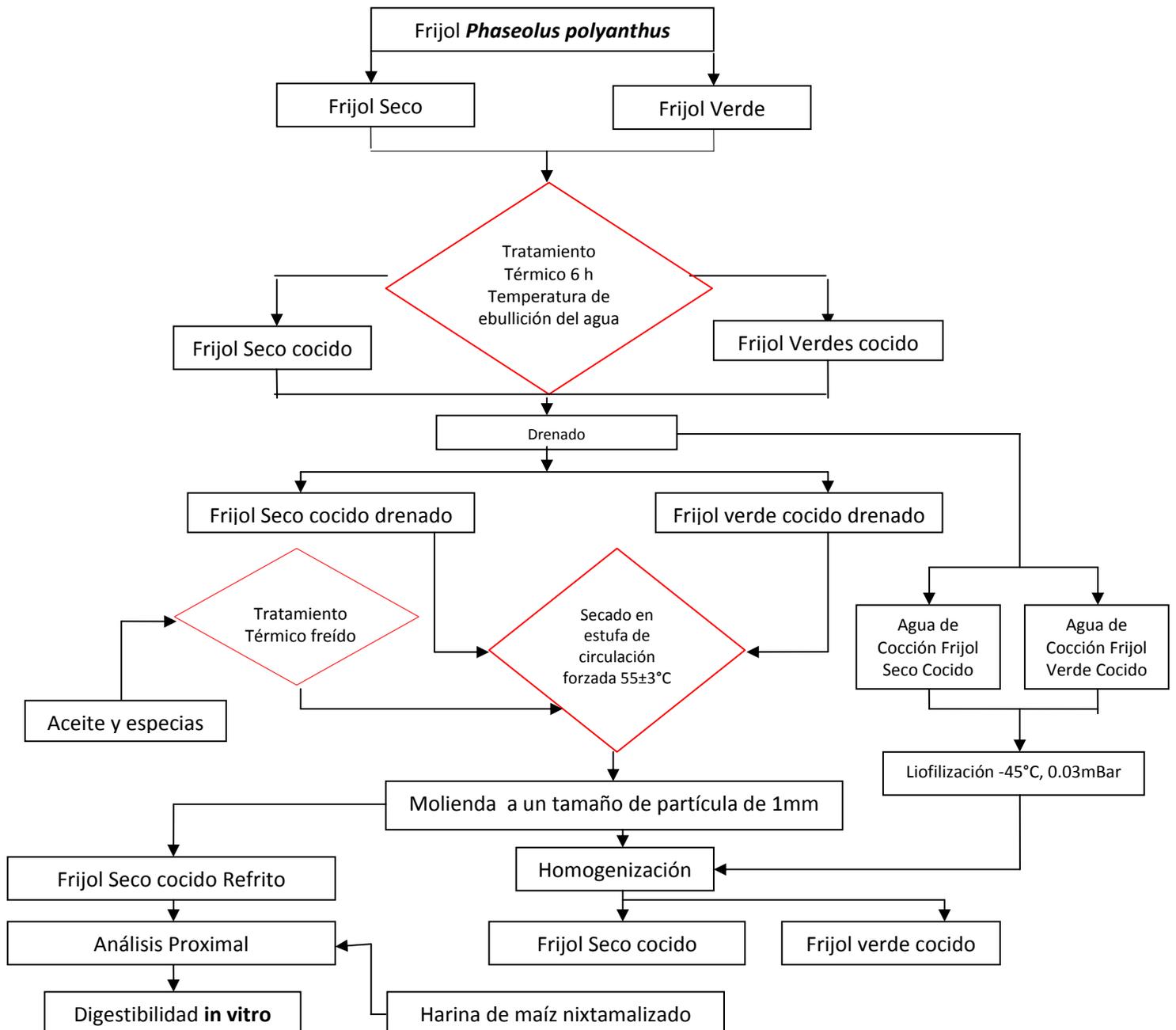


Figura 1. Diagrama de trabajo general de la investigación

En la **Figura 2** se muestra el diagrama de trabajo para la segunda parte, que corresponde a la preparación de las dietas para la realización del ensayo biológico y el uso de la harina de maíz, con la finalidad de hacer dietas complementadas nutricionalmente.

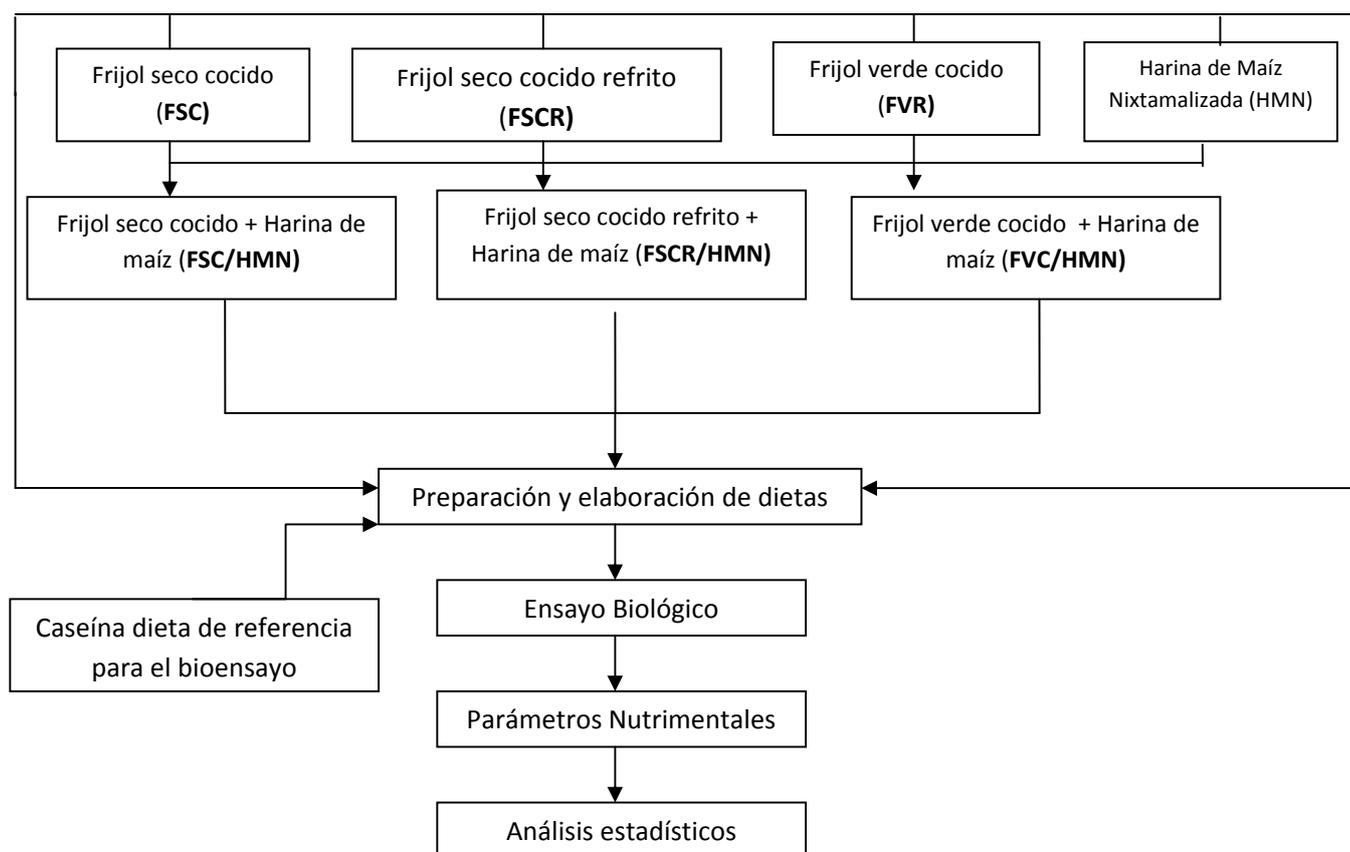


Figura 2. Diagrama de trabajo del ensayo biológico

4.1 Información de la muestra biológica

La muestra biológica utilizada fue frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*), procedente del Municipio de Cuetzalán Puebla (adquirido en el mercado de los domingos de dicha cabecera municipal).

La muestra de frijol seco se transportó en bolsas de polietileno (6 kg), mientras que la muestra de frijol verde o fresco se transportó en costales de rafia (25 kg).

Para la conservación de la muestra del frijol seco no se requirió ningún tratamiento, el frijol verde o fresco, se desvainó y se secó en una estufa de circulación forzada Lab-line modelo Imperial a una temperatura de 55 ± 3 °C durante 48 horas y ambos frijoles se almacenaron en contenedores de plásticos herméticos.

4.2 Tratamiento térmico

A partir de los resultados obtenidos en un trabajo previo (Rodríguez, 2009) la cocción de la muestra se realizó de la forma en la que se prepara en el municipio de Cuetzalán Puebla. En una olla de barro durante seis horas con adición constante de agua la cual debe estar a la misma temperatura por lo que en conjunto se coloca una olla únicamente con agua para mantener la temperatura constante durante todo el tratamiento térmico. Al finalizar la cocción se deja enfriar a temperatura ambiente, se drenó y se separó el frijol del agua de cocción. El frijol drenado se secó en la estufa de circulación forzada Lab-line modelo imperial a una temperatura de 55 ± 3 °C y se realizó una molienda en un molino Thomas Wiley modelo 4 Laboratory-Mill, para obtener un tamaño de partícula de 1 mm, mientras que el agua de cocción se deshidrató en una liofilizadora Labconco modelo Free-Zone 4.5 a -45 °C y un vacío de 0.05 mBar.

Posteriormente se procede a juntar las fracciones de frijol seco y la fracción deshidratada procedente del agua de cocción para simular el consumo usual debido a que por lo regular el frijol cocido se consume con el agua de cocción o caldo (esta acción se lleva a cabo para los tratamientos de frijol seco cocido, frijol verde cocido).

4.3 Preparación de frijol seco cocido refrito

Para el caso del frijol seco cocido refrito, el tratamiento térmico se realiza de la misma manera que el frijol seco cocido; sin embargo este se drena, y se procedió a freír 1.60 kg de frijol cocido, con 40 mL de aceite, 200 g de cebolla y 7.66 g de sal, ya que de esta manera se consume más o menos en el municipio de Cuetzalán Puebla.

4.4 Análisis bromatológico

Se realizó el análisis bromatológico para adecuar los nutrimentos a la composición de la dieta de referencia **Tabla 1.** y hacer las comparaciones pertinentes. Este se realizó basado en el esquema de Weende (Helrich, K. *et al.*, 1990).

Debido a que se contaba como información bromatológica de los tratamientos térmicos denominados para este trabajo frijol seco cocido (FSC) y frijol verde cocido (FVC), se aprovechó esta información para la elaboración de estas dietas (Rodríguez, 2009).

Para el tratamiento de frijol seco cocido refrito (FSCR) se realiza el análisis bromatológico para ajustar los nutrimento de la dieta, esto se realiza en base a la **Tabla 1.**

El maíz utilizado fue adquirido en forma de harina de maíz nixtamalizado marca Minsa (4 kg). Este se homogeneizó obteniendo una muestra representativa a la cual se realizó el análisis bromatológico.

4.4.1 Humedad

Fundamento: La determinación de humedad se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación. El método de determinación directa por gravimetría. Mide la diferencia de masa, al pesar la muestra después de haber retirado el agua mediante evaporación, por lo que se requiere que la muestra sea térmicamente estable (Helrich, *et al.*, 1990).

Material:

- Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- Estufa de vacío Lab Line modelo 3620
- Desecador
- Charolas de aluminio

Procedimiento:

Poner a peso constante la charola de aluminio en donde se va efectuar la determinación, hasta alcanzar el peso constante. Pesar 4 g de muestra a aproximadamente e introducir en la estufa a presión reducida, considerando que la línea de vacío debe dar por lo menos 25 mm de Hg y que la temperatura de secado sea de 60 a 65 °C.

Sacar la muestra y dejar enfriar de 15 a 20 min en un desecador; para su posterior pesado en la balanza analítica éste último pasó hasta obtener peso constante.

Se considera peso constante cuando al pesar una muestra en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal. Efectuar todas las pesadas inmediatamente después de sacarlas del desecador.

Cálculos:

Muestra seca = Muestra seca a peso constante – Charola a peso constante

$$\%H = \left(\frac{\text{Muestra húmeda} - \text{Muestra seca}}{\text{peso de la muestra}} \right) * 100$$

4.4.2 Cenizas

Fundamento: Las cenizas representan la fracción de material inorgánica que posee el alimento, pero para llegar a esa eliminación es necesario eliminar la materia orgánica, esta eliminación se realiza por combustión y calcinación a

temperatura de 550 °C y posteriormente se determina el grado de cenizas totales por gravimetría (Helrich, *et al.*, 1990).

Material y equipos

- Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- Campana de extracción
- Cisoles de porcelana
- Desecador
- Mufla Heraew
- Mechero Fisher

Procedimiento:

Colocar los crisoles en la mufla a una temperatura de 500 a 550°C hasta alcanzar que estén a peso constante, colocándolos en la mufla a 550 °C. Pesar de 2 a 3 g de muestra aproximadamente en cada crisol, El crisol con muestra se coloca sobre un triángulo de porcelana para incinerar en la flama del mechero; con el fin de carbonizar la muestra se realiza en una campana ya que se desprenderá una gran cantidad de humo y esperar que la muestra no desprenda humo. Posteriormente introducir el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse a 500 a 550 °C hasta obtener unas cenizas grisáceas o blancas homogéneas. Sacar la muestra y colocarla en un desecador y esperar 25 minutos aproximadamente y pesar las cenizas hasta obtener a peso constante.

Si después de la incineración se obtienen cenizas con manchas negras es conveniente adicionar unas gotas de agua destilada, una vez que estén frías, se colocan de nuevo a la mufla.

Cálculos:

$$\%Cenizas = \frac{(crisol\ con\ cenizas - crisol\ vacío)}{peso\ de\ la\ muestra} * 100$$

4.4.3 Grasa

Fundamento: Las grasas se definen como un grupo heterogéneo de compuestos que son insolubles en agua, pero solubles en compuestos orgánicos. El contenido de grasas se determina comúnmente por métodos de extracción con disolventes orgánicos, los cuales al ponerse en contacto con el alimento, solubilizan la grasa. Al escoger el disolvente de extracción (éter etílico, éter de petróleo o hexano), se deben tomar en cuenta sus ventajas y desventajas. El éter de petróleo es el solvente más eficaz y se usa en el establecimiento de las normas existentes. La desventaja es que el material debe estar libre de agua o alcohol, ya que el éter húmedo disuelve el azúcar y algunos otros hidratos de carbono; por lo general es indispensable que la muestra esté seca. (Helrich, *et al.*, 1990)

Material y equipo

- Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- Bomba de recirculación Little-giant modelo 1-AA
- Cartuchos de celulosa de 22x80 mm
- Equipo Goldfish Labconco
- Éter etílico (anhidro)
- Estufa de vacío Lab-Line modelo 3620
- Portadedales de vidrio
- Tubos recuperadores de disolvente
- Vasos de borde esmerilado KIMAX

Procedimiento:

Para esta determinación es aconsejable trabajar con la muestra previamente seca con un 8 a 10% de humedad (se recomienda la muestra utilizada en la determinación de humedad). Dentro de un cartucho de celulosa se coloca de 2 a 5 g de muestra (dependiendo del contenido de grasa), se tapa con un pedazo de algodón y se coloca en el compartimiento de extracción. En este cartucho de celulosa se coloca en el porta dedal y este a su vez en el seguro metálico del aparato. A continuación se coloca 50 mL de éter de petróleo sobre el vaso de

borde esmerilado, y este con la ayuda del anillo metálico con rosca se asegura al aparato de extracción de ser necesario subir la parrilla del aparato, hasta que esté en contacto con el vaso. Abrir la llave del agua para que esta circule sobre los refrigerantes.

Al trabajar con éter, es conveniente colocar el control de calentamiento en bajo.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción (4 horas, o que al poner una gota en un pedazo de papel filtro, al secarse deje el papel limpio), bajar las parrillas de calentamiento, y colocar los platillos de seguridad.

Quitar el anillo de rosca y sacar el portadedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador, para recuperar el disolvente. En cuanto el vaso esté libre de disolvente, colocarlo en la estufa de vacío para la completa eliminación de este, hasta un peso constante.

Antes de iniciar el desengrasado se requiere que los vasos se encuentren a peso constante.

Cálculos:

$$\%Grasa = \frac{(vaso\ con\ grasa - vaso\ vacío)}{Peso\ de\ la\ muestra} * 100$$

4.4.4 Fibra cruda

Fundamento: Por definición de acuerdo al método de Weende, la fibra cruda es la pérdida por ignición, del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra con H₂SO₄ al 1.25% y NaOH al 1.25 %. Para la determinación de fibra es necesario trabajar con una muestra desengrasada y someterla a una hidrólisis acida seguida de una hidrólisis alcalina con una posterior incineración del material insoluble para que por diferencia sacar el contenido de hidratos de carbono no-digeribles (Helrich, *et al.*, 1990).

Materiales y equipos

- Aparato de digestión Fibertec marac Tecator modelo 1010
- Antiespumante
- Alcohol etílico
- Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- Crisoles de porcelana
- Estufa de vacío Lab Line modelo 3620
- Embudo Büchner tipo California (malla de 200 mesh)
- Filtro de lino o papel
- Mufla Heraew
- Mechero Bunsen
- Matraz de vidrio
- Solución de H_2SO_4 al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Silicato de aluminio
- Vasos de Berzelius de 600 mL

Procedimiento

Pesar de 3 a 5 g de muestra desengrasada (de preferencia el residuo de la determinación de grasa cruda previa) sobre un vaso Berzelius que contenga 0.5 g de silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio. Adicionar 200 mL de H_2SO_4 al 1.25% (m/v) hirviendo, y unas gotas de antiespumante, colocar inmediatamente en el equipo de digestión, el cuál debe estar previamente caliente y dejar digerir por 30 minutos exactos. Después de dicho periodo vaciar el contenido sobre un Buchner con malla metálica realizar la filtración con ayuda del vacío; lavar con agua caliente hasta eliminar el ácido. Una vez lavado el residuo transferir nuevamente al vaso Berzelius y adicionar 200 mL de NaOH al 1.25% (m/v) y unas gotas de antiespumante inmediatamente colocar en el equipo de digestión, y dejar digerir por espacio de 30 minutos exactos. Trascorrido este tiempo filtrar al vacío con el embudo California y lavar con agua caliente hasta eliminar el álcali, filtrar al vacío, quitar las perlas lavándolas con agua para

recuperar el material adherido. Por último adicionar al residuo 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se transfiere de forma cuantitativamente en un crisol de porcelana a peso constante con cuidado. Colocar en la estufa de vacío para su secado, y después pesarlo, hasta peso constante. Carbonizar e introducir el residuo en la mufla para su incineración, pesar el crisol con las cenizas residuales y por diferencia obtener el contenido de fibra.

Cálculos:

Residuo seco = Residuo seco en estufa a peso constante mas crisol – crisol a peso constante

Residuo calcinado = Residuo calcinado a peso constante mas crisol – crisol a peso constante

$$Fibra\ cruda = \frac{Residuo\ seco - Residuo\ calcinado}{peso\ de\ la\ muestra} * 100$$

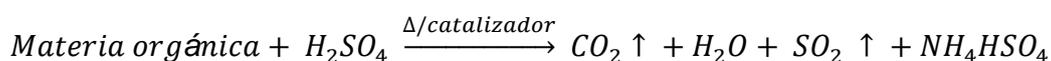
4.4.5 Proteína cruda (Nitrógeno total por el método micro Kjeldahl)

Al considerar que el nitrógeno solo proviene de las proteínas, se puede tener un estimado de su concentración, ya que éste se encuentra en una concentración constante. La mayoría de las proteínas tiene una concentración del 16% de nitrógeno entonces: (Helrich, *et.al.* 1990.)

$$\frac{100\ g\ de\ proteina}{16\ g\ de\ nitrógeno} = Factor = 6.25$$

$$\% de\ proteina\ cruda = \%N * F$$

Fundamento: El procedimiento consiste en una oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico para formar dióxido de carbono, agua y liberar el nitrógeno como amoniaco; éste se encuentra en la solución ácida como sulfato ácido de amonio, debido a que en la mezcla de reacción siempre hay un exceso de ácido.



Ya que en la destilación el amoniaco obtenido es liberado por la adición de NaOH al 40% y atrapado por ácido bórico y formar borato de amonio, para ser titulado con HCl 0.01N. Con este título se obtiene el porcentaje de nitrógeno en la muestra que al ser multiplicado por el factor de conversión de acuerdo a la fuente de proteína se obtiene el porcentaje de proteína cruda.

Material y equipos

- Digestor TECATOR, mod. Ab-20/40
- Dispositivo de destilación TECATOR, Kjeltex Auto 1030 Analyzer
- Tubos de digestión TECATOR de 100 mL
- Mezcla digestiva (a)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R. A.)
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- Solución de HCl 0.01N valorada.

(a) Disolver en su totalidad 3g de sulfato de cobre en 20 mL de agua destilada y una vez disuelta la sal, se agregan 50 mL de ácido ortofosfórico.

A continuación se adicionan con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se deja agitando por aproximadamente 30 minutos.

(b) Pesar 10 g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1 L; adicionar agua hasta disolverlo y adicionar 10 mL del indicador B (100 mg de verde de bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL del indicador de rojo de metilo (100 mg de rojo de metilo en 100 mL de alcohol metílico). El color de la solución es un tono gris, y se afora con agua destilada a 1 L.

Procedimiento:

Digestión de la muestra

Pesar de 10 a 100 mg de muestra, un blanco de glucosa y un blanco de caseína, tratar de la misma forma que las muestras.

De acuerdo al contenido de proteína esperado; en papel cebolla y colocar en el tubo de digestión. Agregar aproximadamente 0.5 g de sulfato de potasio y 3 mL de mezcla digestiva; se coloca el tubo en el digestor por espacio de 15 minutos (370 °C), posteriormente retirar los tubos del digestor a que se enfrié y adicionarle 1.5 mL de H₂O₂ al 30% y nuevamente colocar en el digestor.

Se considera que la digestión está realizada, cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión es transparente con un ligero tono verde-azuloso.

Destilación

La destilación se realiza una vez que los tubos estén fríos. Agregar 25 mL de agua destilada, y realizar la destilación en el equipo AutoKjeltec que proporciona la lectura de mL de ácido gastados para la titulación de la muestra, los cuales son necesarios para conocer el porcentaje de nitrógeno contenido en la misma.

Cálculos:

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa.

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

$$\% \text{ de proteína cruda} = \%N * F$$

Dónde:

P = mL de la titulación de la muestra

B = mL de la titulación del blanco

N = Normalidad de la solución de HCL

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = Factor de conversión de acuerdo a la fuente de proteína.

4.4.6 Hidratos de Carbono.

Los Hidratos de Carbono se calculan por diferencia, es decir, la suma de los porcentajes obtenidos de los componentes principales menos 100%.

$$\text{Hidratos de Carbono} = 100 - [\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ grasa} + \% \text{ proteina cruda} + \% \text{ fibra cruda}]$$

4.5 Densidad energética

Fundamento: Es la cantidad de energía en términos de kJ que genera la combustión de un gramo de alimento o dieta (Helrich, *et al.*, 1990).

Para obtener el contenido energético se utiliza una bomba calorimétrica donde se somete una fracción de la muestra a una combustión total, dentro de un recipiente cerrado y en presencia de un exceso de oxígeno que asegure una completa combustión.

En el caso específico de la bomba calorimétrica, la elevación de la temperatura por efecto de la combustión, es detectado por un termopar, el cual a su vez está acoplado a un galvanómetro de alta sensibilidad, produciéndose una deflexión que se traduce en una lectura, la cual al interpolar en una curva de calibración

previamente establecida de un material de densidad energética conocida, proporcionara su valor energético.

Material y equipos:

- Acido benzoico (Patrón de referencia cuyo valor energético está certificado)
- Bomba calorimétrica balística Gallencamp
- Balanza analítica modelo A-210-P
- Crisol de acero inoxidable de 25.4 mm de diámetro
- Cilindro de oxígeno
- Desecador de vidrio
- Estufa de secado a presión reducida (BLUE M)
- Mecha de algodón de 75 mm de largo
- Mango metálico compactador

Procedimiento

Tratamiento de la muestra

Las muestras deben ser homogéneas, por lo que antes de realizar la determinación se coloca una muestra representativa en un mortero y se homogeneiza, con una humedad menor al 10 %. Posteriormente pesar por cada tratamiento de muestra aproximadamente 500 mg y colocar la muestra en un crisol metálico a peso constante junto con la mecha de algodón quedando una parte de ésta fuera, para después realizar la ignición de las mismas.

El peso registrado correspondería a un peso preliminar.

La compactación de las muestras se realizó con el mango especial para que las muestras quedaran uniformes, con un extremo de mecha dentro de éstas, por lo cual se realizó una segunda pesado para así obtener el peso final.

Ignición de muestras

Colocar de uno en uno cada crisol en la base superior del pilar central de la bomba e introducir la punta libre de la mecha en el alambre de ignición y cerrar el cartucho con el capuchón de tal forma que el cierre sea hermético, colocando el sensor del termopar en el orificio del capuchón.

La presión en la bomba debe ser de 25 bars, el tiempo de 20 a 30 segundos, por lo cual se utiliza un cilindro de oxígeno; alcanzada esta presión se cierra la válvula de paso y se ajusta el indicador del galvanómetro a cero se deben de mantener las condiciones por 10 segundos para oprimir el botón de ignición y comenzar la combustión que da la lectura máxima alrededor de 3 minutos, registrada en el galvanómetro. Una vez termina la combustión desconectar el sensor, liberar los gases y quitar el capuchón para atemperar con hielo para seguir con otras determinaciones.

Esto se realiza para cada muestra y por triplicado.

Cálculos:

Con las lecturas obtenidas de la combustión del ácido benzoico, se convierten los gramos de ácido benzoico a kJ y kcal, para que con los datos se trace la curva de calibración del contenido calórico en kJ (abscisas) vs lectura (ordenadas) e interpolar la densidad calórica de cada muestra.

$$1g \text{ ácido benzóico} = 26454.3 \text{ Joules} = 26.45 \text{ kJ}$$

$$kJ = \text{gramos de ácido benzóico} * 26.45$$

$$kJ \text{ en muestra} = \frac{\text{Lectura del galvanómetro} - b}{\text{peso de muestra (g)}}$$

$$\frac{kJ}{g \text{ muestra}} = \frac{kJ \text{ en muestra}}{g \text{ muestra}}$$

4.6 Digestibilidad proteínica *in vitro*

La AOAC describe un método que utiliza un sistema multienzimático: tripsina, quimotripsina, peptidasa y proteasa bacteriana. Se mide el pH al final del experimento y se determina el porcentaje de digestibilidad con el dato proporcionado por el potenciómetro. La digestión de las proteínas por hidrólisis enzimática, se libera al medio H^+ (por la ruptura del enlace peptídico), disminuyendo así el pH. Asumiendo una correlación entre la liberación de ácido y la digestibilidad de la proteína, ésta última puede evaluarse por el registro de la disminución del pH, mientras más bajo sea el pH más digerible será la proteína. (Helrich, *et al.*, 1990).

Este método enzimático crea un medio muy similar al del tracto gastrointestinal digiriendo las proteínas con una mezcla de enzimas, tiene la ventaja de determinar la biodisponibilidad de la proteína en alimentos que han sido sometidos a algún proceso y es un método relativamente menos costoso que los métodos biológicos.

Material y equipos

- Baños de recirculación a 37 °C y 55 °C de agua con agitación LAB-LINE INSTRUMENT conectados por mangueras.
- Estándar de caseína liofilizada
- HCl 0.1N y 0.05 N (preparar 10 mL de cada una)
- α - quimotripsina pancreática bovina (tipo II) Sigma (C-4129) **1860 unidades** BAEE de α – quimotripsina
- NaOH 2N, 1N, 0.1N Y 0.05 N (preparar 10 mL de cada una)
- Potenciómetro
- Peptidasa intestinal porcina (Grado I) Sigma (P-7000) **2321 unidades** de peptidasa
- Proteasa bacteriana Sigma (P-5147) **65 unidades** de caseína de proteasa
- Solución enzimática (aforar a 10 mL con agua destilada)
- Solución B (aforar 10 mL con agua destilada)
- Tripsina pancreática porcina (tipo IX) Sigma (T-0303) **227040 unidades** BAEE de tripsina

Una unidad de tripsina produce un ΔA_{253} de 0.001 por minuto a pH 7.6 a 25 °C, usando BAEE como sustrato. Contiene 16700 BAEE unidades por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 227040 BAEE unidades de tripsina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg proteína} \times 227040 \text{ unidades BAEE})}{16700 \text{ unidades BAEE}} = 13.59 \text{ mg de proteína}$$

Una unidad de α -quimotripsina hidroliza 1 μmol de BTEE (N-benzoil-L-Tirosina etil ester) por minuto a pH 7.8 a 25 °C. Contiene 54 BAEE unidades por mg de α -quimotripsina. Por lo tanto, para disolver 1860 BAEE unidades de α -quimotripsina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg } \alpha - \text{ quimotripsina} \times 1860 \text{ unidades BAEE})}{54 \text{ unidades BAEE}} = 34.44 \text{ mg quimotripsina}$$

Una unidad libera 1.0 μmol de β -naftilamina de L-Leucina- β -naftilamina por minuto a pH 7.1 a 37 °C. Contiene 102 unidades por g de peptidasa. Por lo tanto para disolver 2321 unidades de peptidasa L-Leucina- β -naftilamina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg peptidasa} \times 2321 \text{ unidades de peptidasa})}{102 \text{ unidades}} = 22.75 \text{ mg proteasa}$$

Una unidad de proteasa hidrolizada para producir color equivalente a 1.0 μmol de tirosina por minuto a pH 7.5 a 37°C. Por lo tanto para disolver 65 unidades de proteasa bacteriana, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg proteasa} \times 65 \text{ unidades de proteasa bacteriana})}{5.5 \text{ unidades}} = 11.81 \text{ mg proteasa}$$

Procedimiento

Se parte de 10 mg de nitrógeno de la proteína (caseína) o muestra según sea el caso. Añadir 10 mL de agua destilada en agitación a una temperatura de 37 °C durante 1 h y medir el pH el cual se ajusta a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH 0.1N según sea necesario. Inmediatamente adicionar 1.0 mL de solución A, la cual debe permanecer 10 minutos exactamente en agitación a una temperatura

de 37 °C. Transcurrido el tiempo, se añade 1 mL de solución B, permaneciendo en agitación durante 9 minutos a una temperatura de 55 °C.

Al término, se coloca la muestra a 37 °C durante 1 minuto y a los 20 minutos exactos con cronometro de haber adicionado la solución A, se mide el pH.

El pH para la caseína control o referencia deberá ser de 6.42 ± 0.05 y sólo hasta que se obtiene este pH en la serie de referencia, se podrá realizar la determinación de las muestras a ensayar.

Cálculos

El % de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente fórmula:

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

4.7 Formulación y elaboración de las dietas.

Se preparan ocho dietas isoproteínicas e isoenergéticas con respecto a la dieta de referencia la cual se muestra a continuación.

Tabla 1 .Dieta de referencia

Ingrediente	Cantidad (g/100g de dieta)
Fuente de proteína (Caseína 100%)	10
Sacarosa	22.3
Glucosa	19.3
Dextrina	25.4
Manteca	8.0
Aceite	6.0
Minerales	4.0
Vitaminas	2.0
Colina (solución al 50%)	0.4
Celulosa	2.6
Total	100

Las dietas preparadas para este experimento fueron las siguientes: dieta de caseína (CAS) dieta de frijol verde cocido (FVC), dieta de frijol seco cocido (FSC), dieta de frijol seco cocido refrito (FSCR), dieta de frijol verde cocido con harina de maíz nixtamalizado (FVC/HMN), dieta de frijol seco cocido con harina de maíz nixtamalizado (FSC/HMN), dieta de frijol seco cocido refrito con harina de maíz nixtamalizado (FSCR/HMN), dieta de harina de maíz nixtamalizado (HMN), su composición se especifica en la **Tabla 3**.

Tabla 2. Composición de las dietas experimentales (g/100g de dieta).

Ingrediente	Dieta							
	CAS (81%)	FSR	FSRHM	HM	FVHM	FS	FSHM	FV
Fuente de proteína	12.3	49.4	24.7	--	24.0	47.9	23.9	48.0
H. maíz^a	--	--	69.3	97.2	69.3	--	69.3	
Sacarosa^b	22.3	11.8	--	--	--	12.2	--	13.2
Glucosa^c	19.3	10.2	--	--	--	10.6	--	11.4
Dextrina^d	25.4	13.4	--	--	--	13.9	--	14.9
Manteca^e	8.0	7.2	6.0	5.5	6.2	7.9	6.3	7.7
Aceite^f	6.0	5.5	4.5	4.2	4.7	5.9	5.0	5.7
Minerales^g	4.0	1.9	2.1	2.7	2.0	1.8	2.0	1.7
Vitaminas^h	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Colinaⁱ	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Celulosa^j	0.25	--	--	--	--	--	--	--
Total	100.0	101.8	109.0	111.7	108.6	102.6	109.15	104.2

^a Sacarosa, marca: Cucurumbe

^b Glucosa Anhidra USP, marca: Química Barsa S. de R. L.

^c Dextrina, marca: Maizena

^d Manteca Vegetal marca: INCA

^e Aceite de Maíz, marca: Patrona (puro de maíz)

^f Mezcla de sales (minerales), marca: MP Biomedicals

^g Mezcla de vitaminas, marca: Biomedicals de Illkrich Francia

^h Celulosa marca: MP Biomedicals

ⁱ Harina de maíz nixtamalizado, marca: Minsa

^j Solución de colina al 50%

Una vez pesados los ingredientes se mezclan para asegurar su completa homogeneización.

4.8 Ensayo biológico

Para el bioensayo se emplean 48 ratas macho Wistar de 21 a 23 días de nacidas (recién destetadas), cuyo intervalo de peso no rebase los 10 g. Las ratas se adquieren en HARLAN Laboratories, S.A. de C.V., el cual se encuentra ubicado en la UNEXA del conjunto E de la UNAM Facultad de Química, UNAM.

Las ratas son pesadas inicialmente y distribuidas homogéneamente de acuerdo al método de la “culebra japonesa” (**Figura 3**). Dichas ratas son divididas en lotes de seis ratas cada uno, considerando el peso de cada una y son colocadas en jaulas individuales, con su respectivo comedero y bebedero.

Dieta	1	2	3	4	5	6	7	8
Inicio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8
→	X16	X15	X14	X13	X12	X11	X10	X9
	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24
	X32	X31	X30	X29	X28	X27	X26	X25
	X33	X34	X35	X36	X37	X38	X39	X40
Final	X48	X47	X46	X45	X44	X43	X42	X41
◀	\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3	\bar{x}_4	\bar{x}_5	\bar{x}_6	\bar{x}_7	= \bar{x}_8

Figura 3. Culebra japonesa

Las condiciones ambientales son las siguientes: se mantiene controlada la temperatura a 24°C, con una humedad relativa entre 30 a 35%, libre de olores y ruidos adversos, con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad.

4.8.1 Relación Neta Proteínica (RNP)

A las ratas se les suministra las dietas preparadas (Tabla 2) y agua *ad libitum*. Un lote de ratas es alimentado con una dieta de caseína como dieta de referencia (la cantidad de proteína de las dietas evaluadas se ajustó a 10%). Cada tercer día se registra el peso ganado y la cantidad de alimento consumido y a los 10 días de experimentación se obtiene el parámetro biológico de Relación Neta Proteínica de acuerdo a las siguientes fórmulas.

$$RNP_i = \frac{[\Delta P_i - \Delta P_{DLN}]}{\sum Al * F}$$

$$\overline{RNP} = \frac{\sum_{i=1}^n RNP_i}{n}$$

$$RNP_{ajustado} = RNP_{exp} \times \frac{RNP_{caseina\ ref.}}{RNP_{caseina\ exp.}}$$

Donde:

ΔP_i = Incremento de peso individual con la dieta de prueba en el lapso de 10 día

ΔP_{DLN} = Incremento de peso con la DLN (g)

Al = alimento individual ingerido en el lapso de 10 días

F = % proteína en la dieta/100 (factor de conversión a proteína)

RNP = Valor de \overline{RNP} promedio

$RNP_{ajustado}$ = Valor de $RNP_{ajustado}$ promedio

$RNP_{caseina\ exp.}$ = Valor RNP de caseína obtenido en el bioensayo

$RNP_{Caseina\ ref.}$ = Valor RNP caseína de referencia, valor 4.16

Se calcula a partir de la ecuación propuesta por (Venegas, 2010), la cual correlaciona el peso inicial con el incremento en peso esperado para dicha dieta, lo anterior se debe a que por principios éticos los cuales, no permite someter a los animales a condiciones extremas de desnutrición como lo es la dieta libre de nitrógeno.

El valor de ΔP_{DLN} se obtuvo con base en la ecuación obtenida de un trabajo previo realizado con la información obtenida del laboratorio de nutrición en la Facultad de Química de acuerdo con las finalidades del bienestar animal, se cuestiona el uso de animales en condiciones extremas de desnutrición, por lo cual es necesario establecer un modelo de correlación por ello se realiza el manejo de datos de la información experimental del promedio de peso inicial (P_i) y el incremento en peso (ΔP) de un lote de animales alimentados con DLN, el cual consta de la organización, selección por medio de criterios de los ensayos realizados en el

laboratorio de Nutrición de la Facultad de Química en un tiempo significativo y se calcula de acuerdo a las siguiente ecuación: (Venegas,2010)

$$\Delta P_{DLN} = -0.114 * (Pi) - 1.461$$

ΔP_{DLN} = Incremento de peso con la DLN (g)

Pi= Peso inicial promedio de la camada a ensayar (g)

4.8.2 Relación de la Eficiencia Proteínica (**REP**)

Esta prueba biológica también corresponde a un ensayo de balance corporal como la prueba de RNP; sin embargo, el ensayo biológico se prolonga por 4 semanas (28 días), llevando el mismo control de animales y dieta ingerida como se realizo en la RNP, pero no se hace uso del lote de animales que se alimentan con una dieta de nitrógeno (DLN), esto se calcula con la siguiente ecuación:

$$REPi = \frac{\Delta Pi}{\Sigma Ali * F}$$

$$\overline{REP} \text{ exp} = \frac{\Sigma_{i=1}^n REPi}{n} \text{ (para caseína)}$$

$$REP \text{ ajustado } i = \overline{REP} i \times \frac{\overline{REP} \text{ caseína ref}}{\overline{REP} \text{ caseína exp}}$$

$$\overline{REP} \text{ ajustado} = \frac{\Sigma_{i=1}^n REP \text{ ajustado}}{n}$$

Dónde:

ΔPi = Incremento de peso individual (en gramos)

ΣAli = Alimento ingerido total individual (en gramos)

F = % de proteína en la dieta/ 100 (factor de conversión a proteína).

$\overline{REP} \text{ exp.}$ = Valor REP promedio obtenido en el bioensayo.

$\overline{REP} \text{ Caseína ref.}$ =Valor de la caseína de referencia =2.5

$\overline{REP} \text{ Caseína exp.}$ = Valor REP de la caseína obtenido en el bioensayo.

REP ajustado= Valor de REP ajustado promedio.

4.9 Evaluación del Índice de Conversión Alimenticia (ICA)

El ICA indica la eficiencia de utilización del alimento alcanzada por el animal de estudio durante un período dado de su ciclo de vida. El cálculo de ICA se realiza considerando el alimento ingerido y el incremento de peso hasta el último día del bioensayo y es calculado así:

$$ICA_i = \frac{\text{Ingesta de alimento}_i}{\text{Incremento en peso}_i}$$

ICA_i = Índice de conversión alimenticia individual

Ingesta de alimento $_i$ = Consumo de alimento individual expresado en gramos

Incremento en peso = ganancia de peso corporal individual expresado en gramos

$$ICA = \frac{\sum_{i=1}^n ICA_i}{n}$$

ICA = Conversión alimenticia promedio del lote alimentado con una dieta de prueba

De acuerdo con esto un valor menor, de ICA significa un uso más eficiente del alimento.

4.10 Evaluación Digestibilidad aparente (Da)

A la par del ensayo biológico REP, se realiza la digestibilidad proteínica *in vivo* y la energía digerible. Las muestras de heces se colectan mediante la colocación de charolas debajo de las jaulas durante los cinco últimos días del bioensayo. Una vez obtenido el material fecal se coloca en frascos individuales etiquetados por rata, posteriormente se mantiene en refrigeración a 4 °C para su conservación. El último día de colecta se procede a secar las heces en una estufa de aire forzado a 60 °C durante 48 horas, se pesan, y posteriormente se reduce su tamaño en mortero para la determinación de nitrógeno y contenido energético.

El cálculo de la digestibilidad aparente se realizó considerando el alimento ingerido en ese mismo periodo de tiempo, utilizando la siguiente fórmula:

$$Da_i = \frac{(N \text{ ingerido} - N \text{ excretado})_i}{N \text{ ingerido}_i} * 100$$

En donde:

Da_i = Digestibilidad aparente individual.

N ingerido = nitrógeno ingerido (proveniente de la ingesta de alimento individual).

N excretado = nitrógeno excretado (correspondiente a las heces excretadas por rata).

Da = Digestibilidad aparente promedio del lote alimentado con una dieta de prueba

$$\overline{Da} = \frac{\sum_{i=1}^n Da_i}{n}$$

4.11 Evaluación del porcentaje de Energía Digerible (%ED)

Para su cálculo se determinó la energía en las heces, utilizando una bomba calorimétrica, el cálculo del %ED se realiza considerando la energía ingerida procedente del alimento ingerido en ese periodo de tiempo, así como la energía excretada utilizando la siguiente fórmula:

$$\%ED_i = \frac{(E \text{ ingerida} - E \text{ excretada})_i}{E \text{ ingerida}_i} * 100$$

En donde:

$\%ED_i$ = porcentaje de Energía Digerible individual.

E ingerida $_i$ = energía ingerida (proveniente de la ingesta de alimento individual).

E excretada $_i$ = energía excretada (correspondiente a las heces excretadas por rata).

$\overline{\%ED}$ = porcentaje de energía digerible promedio del lote alimentado con la dieta de prueba

$$\overline{\%ED} = \frac{\sum_{i=1}^n \%ED_i}{n}$$

4.12 Análisis estadístico

Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una sola vía acoplado a la prueba de rango múltiple de "Duncan" empleando el software STATGRAPHICS plus versión 5.1, para observar la existencia de diferencia entre los valores obtenidos de los diferentes parámetros biológicos evaluados.

La correlación de Pearson es una medida sobre el grado de relación entre dos variables, sin importar cuál es la causa y cuál es el efecto. La dependencia de la que se habla en este sentido es la dependencia entre la varianza de las variables. Cuando más se aleja de 1 o de -1 y si se acerca a cero se tiene menos confianza en la dependencia.

5. Resultados y Discusión

5.1. Análisis químico proximal

El análisis proximal del frijol gordo seco cocido y refrito, se presenta en la **tabla 4**, así como los resultados determinados en un trabajo previo por (Rodríguez, 2009), de la composición de frijol verde cocido (FVC), frijol seco cocido (FSC).

Tabla 4. Análisis bromatológico de los diferentes tratamientos del frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*)^{ab}.

Determinación	FSCR	FVC (Rodríguez, 2009)	FSC (Rodríguez, 2009)
Humedad	5.70±0.90	6.00±0.02	6.37±0.06
Cenizas	4.18±0.67	4.79±0.09	4.54±0.04
Grasa	2.85±0.02	0.49±0.00	1.32±0.01
Fibra cruda	5.47±3.17	9.78±0.27	4.70±0.02
Proteína cruda	20.25±0.60	20.82±0.31	20.95±0.25
Hidratos de carbono digeribles ^c	61.55	57.24	63.04

a Se muestran valores promedio expresados en gramos por 100 gramos de muestra ± desviación estándar ; (n=3) con un CV < 5%

b Resultados expresados en base húmeda

c Valor obtenido por diferencia (%)

Con los resultados del análisis bromatológico mostrado en la **Tabla 4** podemos observar que la muestra con mayor humedad es el **FSC** seguido del **FVC** y con menor humedad el **FSCR**, para la cantidad de cenizas no difiere de manera importante en los diferentes tratamientos. No obstante como era de esperar, el contenido de grasa en las muestras **FVC** y **FSC** es considerablemente menor reportando los valores de 0.49% y 1.32% respectivamente, con respecto a la muestra de **FSCR** donde el valor de grasa es de 2.85%, esto como consecuencia del tratamiento adicional en el cual se utiliza aceite.

Los resultados de fibra cruda se observan valores de 9.78% para **FVC**, 4.70% para **FSC** este refleja el comportamiento de dos fases de desarrollo en las muestras, el **FVC** proviene de una semilla inmadura por lo que refleja un valor mayor de fibra en relación al **FSC** ya que este presenta una maduración mayor, si

comparamos **FSC** vs **FSCR** el valor fue mayor para el **FSCR** de 5.47% esto se debe al tratamiento térmico adicional al cual fue sometido presentando un menor contenido de humedad.

Se puede observar que el contenido proteínico de los diferentes tratamientos no difiere de manera importante, esto considerando que el **FSCR** es sometido a un tratamiento de freído.

Los resultados del análisis bromatológico de la harina de maíz nixtamalizado (**HMN**) se presentan en la **Tabla 5** los cuales se expresan en base húmeda.

Tabla 5. Análisis bromatológico de (HMN)^a

Determinación	HM ^b
Humedad	6.50 ± 0.14
Cenizas	1.29 ± 0.02
Grasas	4.42 ± 0.02
Fibra Cruda	1.29 ± 0.10
Proteína Cruda	7.21 ± 1.08
Carbóno Hidratos^b	79.28

a Se muestran valores promedio expresados en gramos por 100 gramos de muestra ± desviación estándar ; (n=3) con un % CV < 5

b Valor obtenido por diferencia

En el análisis de la **tabla 5** se puede observar que la **HMN** es muy buena fuente de Carbohidratos no siendo así con el contenido de proteína y grasa que representa valores bajos.

5.2 Digestibilidad *in vitro*

Los resultados de la digestibilidad *in vitro* se presentan en la **Tabla 6** donde se incluyen datos de FVC Y FSC de un trabajo previo (Rodríguez, 2009).

Tabla 6. Digestibilidad *in vitro*

Determinación	FSCR ^a	HMN ^a	FVC (Rodríguez, 2009)	FSC (Rodríguez, 2009)
Digestibilidad <i>in vitro</i>	86.32 ± 0,14	70.15 ± 3.77	86.51 ± 0.16	84.82 ± 0.64

a Valor obtenido experimentalmente en este trabajo de la determinación realizada por triplicado; (n=3)

En la tabla 6 se puede observar que la digestibilidad *in vitro* de **FVC** no difiere con el valor obtenido del **FSCR**, sin embargo estos son ligeramente mayores al valor reportado para el **FSC**, esto posiblemente se deba a la etapa de desarrollo del frijol (Gonzales, 2001). Es interesante hacer notar que presento un valor alto no obstante el ser muestras de origen vegetal.

5.3 Preparación de la dieta.

Fue necesario realizar el ajuste de componentes con la finalidad de preparar dietas isoproteínicas e isoenergéticas.

En la **Tabla 7** se presentan los datos de concentración de proteínas y densidad energética de las diferentes dietas. Para corroborar que las dietas son isoproteínicas e isoenergéticas con respecto a la dieta de referencia (caseína).

Tabla 7. Valores de proteína y densidad calórica de las dietas. ^a

Dieta	Valor real de proteína	Densidad calórica ^c
CAS	11.0 ± 0.40	19.94 ± 0.20
FVC	9.3 ± 0.12	19.46 ± 0.80
FSC	11.0 ± 0.24	19.54 ± 0.32
FSCR	10.8 ± 0.35	19.01 ± 0.06
HMN	6.6 ± 0.23	19.37 ± 0.62
FVC:HMN	9.5 ± 0.47	19.25 ± 0.40
FSC:HMN	10.8 ± 0.16	19.60 ± 0.54
FSCR:HMN	10.0 ± 0.26	19.97 ± 0.48

^a Se muestran valores promedio ± desviación estándar ;(n=3) con un CV < 5%

^b Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra(%)

^c Resultados expresados en kJ por gramo de muestra

En la **Tabla 7** se observa los mayores valores reales de contenido de proteína en las dietas de **CAS** y **FSC**. La dieta de referencia muestra un valor 11% que no era lo esperado lo anterior fue debido a que el lote del aislado de caseína mostró una mayor concentración de proteína de lo reportado en la etiqueta. Para la dieta **FSC** el valor alto se puede deber en parte a la manipulación en la elaboración de las dietas.

Para, la dieta **HMN** se obtiene un valor menor en relación al resto de las dietas debido que es difícil de ajustar al 10% de proteína ya que el cereal posee una cantidad menor de este porcentaje de proteína; sin embargo, la CAS se utilizó de manera comparativa para evidenciar el sinergismo que debe presentarse en la complementación Harina de maíz nixtamalizado - frijol.

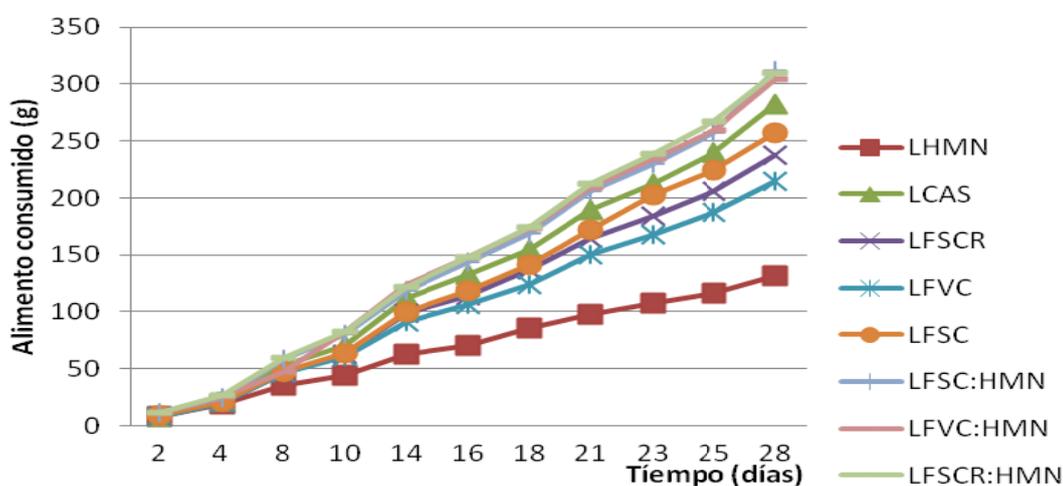
Los datos presentados en la **Tabla 7**, son los que se utilizaron para calcular los parámetros biológicos: REP, RNP, Da y %ED

5.4 Ensayo Biológico

Una vez alimentadas las ratas con las 8 dietas y contando con los resultados de alimento consumido versus tiempo de experimentación y crecimiento versus tiempo de experimentación se elaboraron las siguientes graficas.

5.4.1 Alimento consumido

En la **Gráfica 1** se muestra el consumo de alimento acumulativo de los distintos lotes con respecto al tiempo.



Gráfica 1. Alimento consumido acumulado

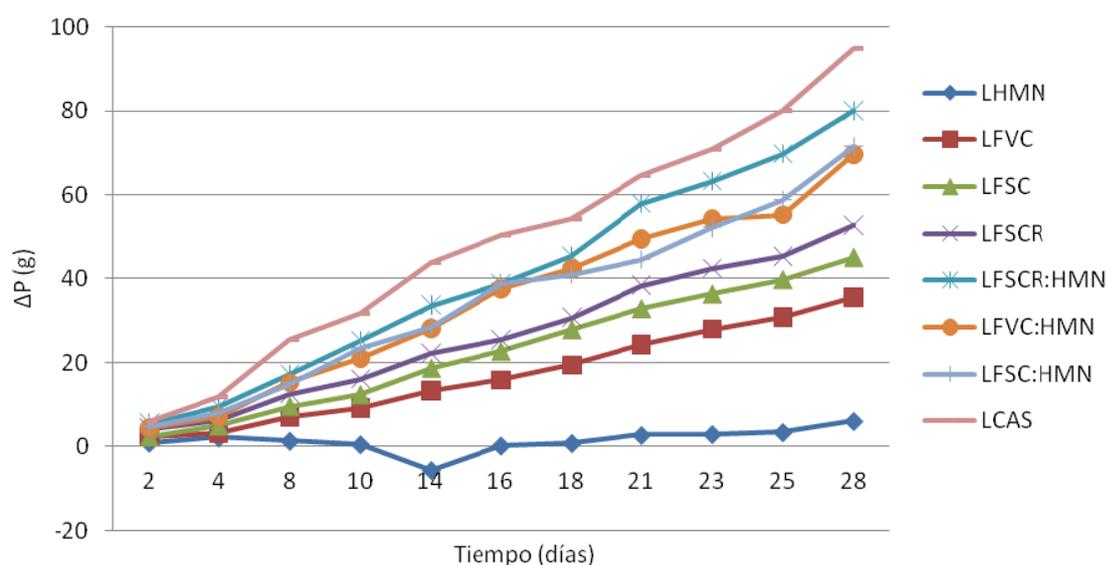
Abreviaturas: Lote de animales alimentados con la dieta de caseína (**LCAS**), Lote de animales alimentados con la dieta de Harina de Maíz Nixtamalizado (**LHMN**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Seco Cocido Refrito (**LFSCR**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Seco Cocido Refrito /Harina de Maíz Nixtamalizado, (**LFSCR:HMN**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Verde Cocido (**LFVC**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Verde Cocido/ Harina de Maíz Nixtamalizado (**LFVC:HMN**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Seco Cocido (**LFSC**) y Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Seco Cocido/ Harina de Maíz Nixtamalizado (**LFSC:HMN**).

La **Gráfica 1** muestra un aumento en el consumo de alimento a lo largo del bioensayo esto en consecuencia de la necesidad en los requerimientos alimenticios por parte del animal para formar tejidos y el desarrollo de sus órganos lo que tiene por consecuencia un aumento de peso. Sin embargo, los animales alimentados con la dieta de **HMN**, se observó una diferencia significativa en el consumo de alimento con respecto al resto de los lotes.

Los animales de **LFSCR:HMN** , **LFSC:HMN** y **LFVC:HMN** tuvieron un mayor consumo de alimento incluso mayor que el **LCAS**, lo que indica un mayor consumo en las dietas complementadas frijol-maíz. En cuanto **LFSCR**, **LFSC** y **LFVC** el consumo de este fue menor a los complementados, e incluso al **LCAS**, lo que indica de antemano que los animales alimentados con estas dietas tendrán un menor desarrollo, en donde también pueden influir la palatabilidad de las dietas en cuestión (Juandeabaurre. et al., 2013).

5.4.2 Curvas de crecimiento

La **Gráfica 2** presenta el crecimiento de los animales con respecto al tiempo de las diferentes dietas y el comportamiento de cada lote de animales alimentados con las diferentes dietas.



Gráfica 2. Curva de crecimiento en el desarrollo experimental PER

Abreviaturas: Lote de animales alimentados con la dieta de caseína (**LCAS**), Lote de animales alimentados con la dieta de Harina de Maíz Nixtamalizado (**LHMN**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Seco Cocido Refrito (**LFSCR**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Seco Cocido Refrito /Harina de Maíz Nixtamalizado, (**LFSCR:HMN**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Verde Cocido (**LFVC**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Verde Cocido/ Harina de Maíz Nixtamalizado (**LFVC:HMN**), Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Seco Cocido (**LFSC**) y Lote de animales alimentados con la dieta de Frijol Seco Cocido/ Harina de Maíz Nixtamalizado (**LFSC:HMN**) .

En la **Gráfica 2**, se observa que los lotes de ratas alimentadas con las dietas formuladas con frijol en sus diferentes formas como única fuente de proteína, y de frijol en complementación con maíz, se presenta un crecimiento ascendente; sin embargo aun están por debajo del lote alimentado con la dieta de referencia. Las de menor crecimiento fueron las ratas alimentadas del **LHMN**, ya que además de ser una proteína de baja calidad (debido a la deficiencia de los aminoácidos indispensables lisina y triptófano), la cantidad de proteína que aporta es menor al 7%, a demás mostró un comportamiento de mantenimiento, es decir prácticamente no hubo crecimiento.

Los animales alimentados con la dieta de caseína presentan el mayor crecimiento ya que se considera una proteína de buena calidad, por contener todos los aminoácidos indispensables en una proporción adecuada.

El incremento de peso refleja la calidad y biodisponibilidad de la proteína consumida, es decir (mayor calidad y biodisponibilidad de la proteína) a mayor incremento de peso mayor calidad proteínica y lo contrario. En el caso de las dietas de frijol como única fuente de proteína, la calidad de esta es similar, sin embargo la biodisponibilidad de la misma difiere.

De acuerdo al comportamiento de los **LFSCR, FSC y FVC** el que posee un crecimiento mayor es el **LFSCR**, debido a que se realizó un tratamiento adicional de freído por lo que se puede asumir que la biodisponibilidad de la proteína es mayor, este es seguido por los **LFSC** y **LFVC**, la diferencia entre estas se puede asumir con la cantidad de fibra, ya que tiene un impacto en la absorción de las proteínas, como se muestra en la **Tabla 4** el **LFSC** posee mayor cantidad de fibra que el **LFVC** por lo que la absorción de la proteína del **LFVC** se ve disminuida. Con respecto a los lotes complementados se puede observar la complementación frijol-maíz se encuentran por arriba de los lotes en donde la única fuente de proteína es el frijol, y **HMN**. En este caso se observó que las complementaciones **LFVC: HMN** y **LFSC: HMN** muestran un comportamiento similar y por arriba de éstas se encuentra **LFSCR:HMN**, así mismo, se observar que los lotes complementados están por debajo de la referencia **LCAS**.

5.4.3 Índice de Conversión alimentaria (ICA)

La **tabla 8** muestra los valores promedios índice de conversión alimenticia para cada tratamiento el cual muestra la tendencia en el aprovechamiento que cada lote tuvo del alimento (de todos los nutrientes del mismo).

Tabla 8. Valores de Índice de Conversión Alimenticia (ICA)*

LOTE	ICA \pm DE**
LCAS	2.99 ^g \pm 0.17
LFVC	6.10 ^b \pm 0.59
LFSC	5.62 ^c \pm 0.41
LFSCR	4.63 ^d \pm 0.81
LHMN	21.82 ^a \pm 6.50
LFVC:HMN	4.37 ^e \pm 0.25
LFSC:HMN	4.37 ^e \pm 0.28
LFSCR:HMN	3.91 ^f \pm 0.34

*Se muestran valores promedio \pm desviación estándar; (n=6) con un coeficiente de variación <15%

**Letras iguales indican dentro de la columna que no existe diferencia significativa (p=0.005)

Los resultados obtenidos en la **tabla 8** nos muestran que el lote control CAS arroja el valor más bajo como se esperaba, esto nos indica que su aprovechamiento es el mejor, es decir se necesitan 2.99 g de alimento para producir un gramo de peso vivo.

Con respecto a los lotes de frijol se observó diferencia significativa en las tres formas de consumo sin complementación, con un valor mayor el **LFVC**, posteriormente tenemos el **LFSC**, y por último el **LFSCR** por lo que se requiere menor cantidad de este alimento para producir un gramo de peso corporal, es decir tiene un mejor aprovechamiento.

Así mismo se puede observar que los lotes de frijol-maíz hay sinergismo ya que los valores de ICA son menores a los obtenidos de las fuentes por separado por lo que el aprovechamiento de éstos es superior.

Con respecto a los animales de los **LFSC:HMN** y **LFVC:HMN** no existe diferencia significativa, pero arrojando un valor menor de ICA tenemos el **LFSCR: HMN** por lo que se necesita menos alimento para producir peso vivo.

En el caso de el **LHMN** presento el valor más alto, esto indica que se necesitan 21.82 g de alimento para producir un gramo de peso vivo lo cual refleja un pobre aprovechamiento de la dieta de **HMN**.

5.4.4 Relación Neta Proteica (RNP)

En la **Tabla 9** se presentan los resultados promedio de la Relación Neta Proteica (RNP) de cada dieta analizada.

Tabla 9. Valores de RNP de las dietas evaluadas. *

LOTE	RNP*
LCAS	4.24 ^e ± 0.58
LFVC	1.76 ^b ± 0.52
LFSC	1.86 ^{bc} ± 0.38
LFSCR	2.48 ^{cd} ± 0.33
LHMN	0.46 ^a ± 0.88
LFVC:HMN	2.81 ^d ± 0.35
LFSC:HMN	2.80 ^d ± 0.24
LFSCR:HMN	3.19 ^d ± 0.71

*Se muestran valores promedio ± desviación estándar; (n=6) con un coeficiente de variación < 20% (con excepción de el LFVC y LHMN)

**Letras iguales indican dentro de la columna que no existe diferencia significativa (p=0.005).

En la **Tabla 9** se puede observar que el **LCAS** arrojó el valor más alto, lo que indica que su valor nutritivo es alto como era de esperar.

Los lotes complementados no arrojan diferencia significativa entre sí, por lo que su aprovechamiento es similar. Se corrobora el efecto de la complementación frijol-maíz para los **LFSC:HMN**, **LFVC:HMN** y **LFSCR:HMN**, ya que éstos muestran un mejor aprovechamiento que las fuentes de proteína por separado. Las dietas de **LFSC:HMN** y **LFVC:HMN** no presentaron diferencia significativa y como era de esperar si hubo diferencia significativa con la de **LCAS**. Con respecto al lote **HMN** presenta un valor de RNP muy bajo debido a que la calidad de la proteína del maíz es baja ya que esta es deficiente en los aminoácidos indispensables (triptófano y lisina), además de tener la dieta el nivel más bajo de proteínas (<7%), estudios anteriores como el de (Juandeabaurre, 2013) muestran el bajo contenido proteínico del maíz.

5.4.5 Relación de eficiencia proteínica (REP)

En la **Tabla 10** se presentan los resultados promedio de la Relación de Eficiencia Proteínica (PER) de cada dieta analizada.

Tabla 10. Valores de REP ajustado de las dietas evaluadas*.

LOTE	REP ajustado**
LCAS	2.50 ^g ± 0.23
LFVC	1.46 ^{bc} ± 0.14
LFSC	1.39 ^b ± 0.20
LFSCR	1.67 ^{cd} ± 0.20
LHM	0.58 ^a ± 0.14
LFVC:HMN	1.98 ^e ± 0.11
LFSC:HMN	1.86 ^{de} ± 0.11
LFSCR:HMN	2.26 ^f ± 0.26

*Se muestran valores promedio ± desviación estándar; (n=6) con un coeficiente de variación <15%

**Letras iguales dentro de la columna indican que no existe diferencia significativa.

En la **Tabla 10** se presenta los resultados de la REP ya ajustados, donde se puede observar el valor de 2.5 para el **LCAS** igual al reportado en la literatura. A continuación se discuten los resultados.

En los lotes donde la única fuente de proteína es el frijol no existe diferencia significativa para los **LFSC** y **LFVC**, y presentan valores menores que el **LFSCR**, pero solo muestra ser estadísticamente superior al el **LFSC**, el **LFSCR** no mostró diferencia significativa con respecto al el **LFSC:HMN**.

Los lotes complementados muestran el efecto de la suplementación frijol-maíz, no encontrándose diferencia significativa entre **LFSC:HMN** y **LFVC:HMN**. No obstante el **LFSCR:HMN** con un **REP** de 2.26 muestra diferencia significativa con los anteriores, encontrándose cerca del valor del **LCAS** (2.50); aunque no existe diferencia significativa contra el control de referencia. Con respecto al lote **LHMN** 0.58 se observa un valor muy por debajo de los otros lotes analizados.

De acuerdo a los resultados de las **Tablas 9 y 10** se corrobora que el parámetro biológico REP ofrece una mejor discriminación de la calidad nutritiva de los lotes complementados ya que a diferencia de la RNP, el PER si marca una diferencia significativa entre el lote **FSCR:HMN** con los otros lotes complementados, arrojando un valor muy cercano al obtenido para el lote de animales alimentados con la dieta de **CAS**.

La calidad de una proteína está relacionada fundamentalmente con su composición de aminoácidos indispensables, y con su digestibilidad. Las proteínas de alta calidad son las que contienen todos los aminoácidos indispensables en una buena proporción. Para ambos parámetros nutrimentales se evidencia el sinergismo que proporciona la complementación frijol-maíz, ya que los valores de ambos parámetros biológicos son mayores a los obtenidos en los lotes de frijol como única fuente de proteína o sólo la proteína de maíz, esto debido a que la proteína obtenida aumenta su calidad al corregir la deficiencia de las fuentes individuales como se corrobora en el presente bioensayo.

5.4.6 Digestibilidad aparente (Da)

La evaluación de Da, sigue siendo una herramienta útil, por lo que se realizó una comparación de los resultados de Da obtenidos en el bioensayo con los resultados de digestibilidad *in vitro*.

En la **Tabla 11** se observa que el valor más alto de biodisponibilidad proteínica la presento el **LCAS** debido a que su valor nutritivo es mayor. El **LHM** es el que tiene un menor valor de **%DA**, por su al bajo contenido proteínico y la biodisponibilidad.

Tabla 11. Valores de porcentaje de Da de las dietas evaluadas*.

LOTE	%Da**
LCAS	87.20 ^e ± 2.18
LFVC	70.96 ^b ± 2,36
LFSC	77.27 ^c ± 7.07
LFSCR	77.31 ^c ± 3.95
LHMN	65.46 ^a ± 6.76
LFVC:HMN	77.38 ^c ± 3.28
LFSC:HMN	77.38 ^c ± 3.55
LFSCR:HMN	80.16 ^d ± 2.02

*Se muestran valores promedio ± desviación estándar, (n=6) con un coeficiente de variación <15%

**Letras iguales dentro de la columna indican que no existe diferencia significativa.

Los **LFSC**, **LFSCR**, **LFVC:HMN** y **LFSC:HMN** muestran una mejor disponibilidad proteínica en relación al **LHMN** y al de **LFVC**. Entre las dietas de **LFSC**, **LFSCR**, **LFVC:HMN** y **LFSC:HMN** entre ellos se observa que la disponibilidad es similar, posiblemente ó asociado a que se realizan los ajustes para obtener dietas y a el contenido proteínico de cada dieta y las cantidades de fibra que tienen similar las dietas de **LFSC**, **LFSCR**, **LFVC:HMN** y **LFSC:HMN**.

El **LFSCR/HMN** es la que presento mayor digestibilidad después de la del **LCAS**, este comportamiento proteínico se le atribuye al tratamiento térmico y el refreído, aunado con la suplementación.

5.4.7 Energía Digerible (% ED)

Una vez determinado el contenido energético en las dietas y energía excretada en heces, fue posible calcular el porcentaje de Energía Digerible (% DE) para cada lote analizado.

Tabla 12. Valores de porcentaje ED de las dietas evaluadas. *

LOTE	%ED \pm CV**
LCAS	93.74 ^f \pm 1.11
LFVC	85.99 ^b \pm 0.80
LFSC	86.54 ^c \pm 5.30
LFSCR	87.58 ^d \pm 1.84
LHMN	76.81 ^a \pm 3.07
LFVC:HMN	90.11 ^e \pm 1.44
LFSC:HMN	90.28 ^e \pm 1.60
LFSCR:HMN	90.51 ^e \pm 0.85

*Se muestran valores promedio \pm desviación estándar; (n=6) con un coeficiente de variación <10%

**Letras iguales dentro de la columna indican que no existe diferencia significativa.

Se presenta en la **Tabla 12** los porcentajes **ED** de los diferentes lotes, encontrando que el **LCAS** control arroja el valor más alto, esto nos indica que existe un mejor aprovechamiento energético de la dieta de referencia.

En cuanto a los lotes de frijol sin complementación se puede observar que existe diferencia significativa entre los mismos siendo el de mejor aprovechamiento energético el **LFSCR**. Siguiendo con los lotes complementados frijol-maíz se puede observar el efecto de la suplementación ya que fueron superiores al frijol solo, además estos no mostraron diferencia significativa entre sí. Con respecto a el **LHMN** este reporta el valor más bajo, esto nos indica que el aprovechamiento de este es menor como en todos los demás parámetros evaluados.

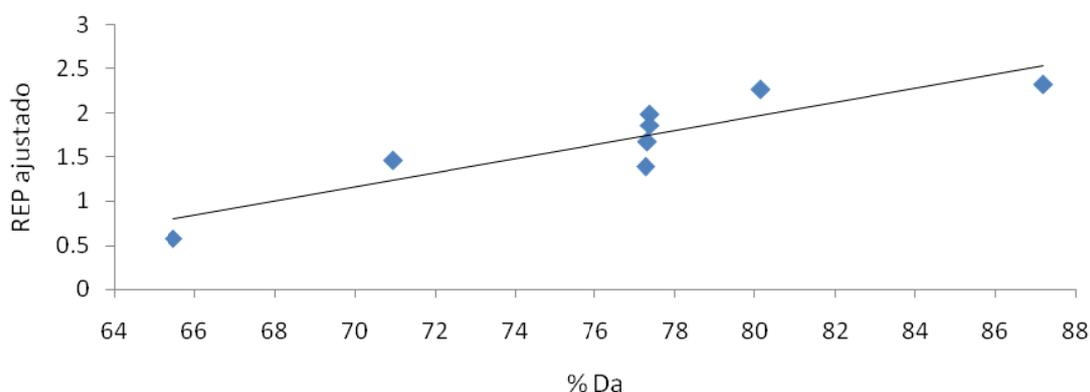
5.5 Análisis de correlación

En la **Gráfica 3** se muestra la relación entre la relación de eficiencia proteínica y la digestibilidad aparenten, esperando que exista un relación entre la proteína ingerida utilizada para el crecimiento del animal y la disponibilidad de la proteína ingerida.

Tabla 13. Valores de Coeficiente de correlación entre REP Y %Da

LOTE	%Da	REP ajustado	r		m		b	
LHM	65.46	0.58	0.9241		0.0862		- 4.8968	
LFVC	70.96	1.46						
LFSC	77.27	1.39						
LFSCR	77.31	1.67						
LFVC:HM	77.38	1.98						
LFSC:HM	77.38	1.86						
LFSCR:HM	80.16	2.26						
LCAS	87.20	2.50						

Grafica 3.- REP ajustado vs % Da



En este caso para el **REP** ajustado y el **%Da** de los lotes alimentos con distintas dietas, se puede observar de la **Tabla 13** que el valor del coeficiente de correlación **r** es significativo, pero como el número de datos analizados (**n**) es relativamente pequeño es necesario realizar la prueba de intervalos de confianza para el coeficiente de correlación la cual se describe a continuación.

En donde:
$$t_o = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} = 4.2969$$

$r = 0.9241$

$n = 8$

$r^2 = 0.85$

c = valor de tablas

Por lo tanto **t_o = 4.2969**; **c = 1.94** donde $4.2969 > 1.94$ **por lo cual se rechaza la hipótesis.**

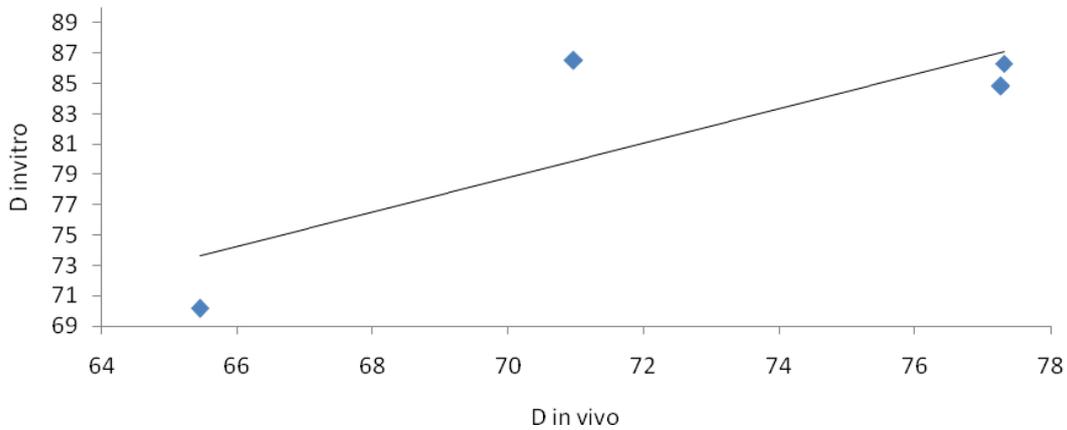
El análisis estadístico indica que **existe correlación**, por lo cual es posible predecir con la digestibilidad aparente (**Da**) la relación de eficiencia proteínica **REP** ajustado con un 95% de confianza.

La **Gráfica 4** muestra la posible relación entre la digestibilidad aparente **in vitro** y la digestibilidad verdadera **in vivo** de las diferentes muestras de frijol gordo y de la **HMN**

Tabla 14. Valores de Coeficiente de Correlación entre la Digestibilidad *in vitro* y Digestibilidad *in vivo*

Dieta	(x) D <i>in vivo</i>	(Y) D <i>in vitro</i>	r	m	b
HM	65.46	70.15	0.8192	1.1352	-0.6322
FSC	77.27	84.82			
FVC	70.96	86.51			
FSCR	77.31	86.32			

Grafico 4. Digestibilidad *in vitro* vs *in vivo*



En este caso para la Digestibilidad *in vitro* y la Digestibilidad *in vivo* de las diferentes formas de frijol analizadas y la **HMN** se observa en la **Tabla 14**, que el valor de r es bajo considerando n , por lo que para establecer si realmente existe una correlación entre los datos, es necesario realizar la prueba de intervalos de confianza para el coeficiente de correlación la cual se describe a continuación.

En donde:

$$t_0 = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}} \approx 2.0200$$

$$r = 0.8192$$

$$n = 4$$

$$r^2 = 0.6710$$

Por lo tanto $t_0 = 2.0200$; $c = 2.92$ donde $2.0200 < 2.92$ por consiguiente no se rechaza la hipótesis nula $\rho = 0$ y **no existe correlación**.

El análisis estadístico indica que no existe correlación ya que se necesitan más datos.

Como ya se mencionó los métodos *in vitro* están relacionados más a la digestibilidad verdadera que a la aparente, porque estos son incapaces de estimar las pérdidas metabólicas por heces de origen endógeno. Las pérdidas metabólicas son mucho más influenciadas por el estado fisiológico y las condiciones del animal. No obstante como se muestra en el análisis existe correlación es decir la digestibilidad un vitro es una buena estimación para conocer el comportamiento de los animales de experimentación con dicha fuente proteínica.

6. Conclusiones

- ❖ Se obtuvo un preparado del frijol gordo (FSCR) el cual mostró una composición Bromatológico muy parecido a los otros preparados de este frijol obtenidos en un trabajo previo.
- ❖ Se realizó el ensayo biológico bajo los protocolos establecidos de las tres formas como se consume el frijol gordo en Cuetzalan Puebla, así como de la complementación con maíz, donde se corroboró el efecto de la suplementación de estas dos fuentes de proteína (cereal-leguminosa).
- ❖ Se obtuvo una buena calidad nutrimental en el preparado de FSCR y una complementación con HMN, asociado que al refreír el frijol las proteínas quedan más disponibles, debido al doble tratamiento térmico y por eso refleja una mejor calidad proteínica.
- ❖ Se corrobora que la combinación frijol-maíz tiene una suplementación proteínica adecuada.
- ❖ El parámetro biológico que mejor discrimino la calidad nutrimental de los diferentes preparados de frijol gordo fue el REP, mostrando el FSCR así como su complementación con maíz FSCR/HMN, fue la que mostro mejor calidad nutrimental.
- ❖ Se muestra que se puede predecir con la Digestibilidad aparente la Relación de eficiencia proteínica con un 95% de confianza de esta fuente proteínica.
- ❖ No se muestra correlación en Digestibilidad *in vivo* vs Digestibilidad *in vitro* en esta fuente de proteína ya que se requieren más datos.

7. Bibliografía

- ❖ Adrián, J., Potus, J., Poiffait, A., Dauvillier, P., Análisis nutricional de los alimentos, Ed. Acribia, Zaragoza, pág. 247-262 (2000).
- ❖ Aguilar, J. A. Composición nutricia de 10 variedades de maíz y la evaluación de la suplementación de 4 de estas variedades con una especie selecta de leguminosas. Tesis Maestría de la UNAM, México, D. F., pág. 27-31(2009).
- ❖ Basurto, Aspectos etnobotánicas de *Phaseolus coccineus* L y *Phaseolus polyanthus* Greenman, La sierra norte de Puebla, México. Tesis de Maestria de la UNAM- México, D.F., pág. 1, 3, 5, 14-15. (2000).
- ❖ Blanco, A, Bressani R., Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseoulus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 41:38-51. (1991).
- ❖ Boutrif, E. <http://www.fao.org/docrep/u5900t/u5900t07.htm>, Orgaizacion de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, consultada el 13 Junio de 2014 a las 22:40
- ❖ Buraczewska, L and Wasliewko J. Formulation of pigs diets according to ideal digestible amino acid content. *Journal of Animal and Feed Sciences* 9:13-24. (1999).
- ❖ Cabaño L., Valor nutritivo de los cereales en conejos., Barcelona, XI Curso de especialización FEDNA., Departamento de Producción Animal, Universidad Platense de Madrid. Madrid pág.194-199 (1995).
- ❖ Coultate ,T.P, Manual de química y bioquímica de los alimentos Acribia, S.A Zaragoza, pág.145-147 (1996).
- ❖ Engleman, M. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Introducción General. Editorial E. Mark Engleman publicado por Colegio de posgrado Chapingo, Texcoco. pág. 15-22. (1979)

- ❖ Ernest, D. http://www.fcv.unl.edu.ar/media/institucional/comite_etica_seguridad/documentos/ManualsobrelcuidadoyusodeanimalesdeexperimentacionConsejo20Canadiense.pdf, Consejo Canadiense de Protección de los Animales, consultada el 9 de junio de 2014 a las 21:53
- ❖ Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura /Organización mundial de la salud (FAO/OMS) Protein quality evaluation, Report of Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, (1990)
- ❖ Fernández H., El programa interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio en las instituciones biomédicas docentes, de investigación científica e industria. Acta Bioética 13:1 (2007)
- ❖ Flores, L. C. Proceso óptimo de cocción de una variedad de Frijol (*Phaseolus vulgaris*) de amplio consumo con un alto contenido de lectina. Tesis Licenciatura de la UNAM. México, D. F., pág.7, 16. (2010)
- ❖ Fox, B. A. y Cameron A. G. Ciencia de los alimentos, Nutrición y Salud. Limusa, Noriega Editores. 5a edición. pág. 195-199 (1997).
- ❖ García U, La alimentación de los mexicanos. Cambios sociales y económicos, y su impacto en los hábitos alimenticios, CANACINTRA, Cámara Nacional de la industria de Transformación pág.16, 23 (2012)
- ❖ Gilani G, and Cockell K., Effects of Antinutritional Factors on Protein Digestibility and Amino Acid Availability in Foods; Journal of AOAC International, 88(3); 967-987.
- ❖ Gonzales, P., Efecto del procedimiento con calor sobre la cuantificación de lectinas de frijol y su toxicidad remanente ;Tesis de licenciatura de la UNAM, México, D.F, Pag.10-14.(2005)
- ❖ Gutiérrez, A., Efecto de varios niveles de energía digestible y proteína en la dieta sobre el crecimiento de gamitana (*Colossoma macropomum*) ,178-186 (2009)

- ❖ Herlich, K., Official Methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC International, 15th edition, chapter 1, Arlinton. Pp. 33-36,42-47 (1990).
- ❖ Jean, A., Jacques ,P., Annie, P., Analisis nutricional de los alimentos, Editorial Acriba, S.A Zaragoza, pág. 247-250. (2000)
- ❖ Juandeabaurre, M., Rodríguez, A., Evaluación de la calidad proteínica y biodisponibilidad de hierro y calcio en la mezcla de frijol Peruano cocido y harina de maíz nixtamalizado mediante métodos biológicos, Tesis de la UNAM, México, D.F, pág. 59. (2013)
- ❖ Manríquez, J., La digestibilidad como criterio de evaluación de alimentos - su aplicacion en peces y en la conservacion del medio ambiente, *Food and Agriculture Organization* FAO
<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S08.htm>,. *consultada el 9 de junio 2014 a las 19:50*)
- ❖ Martínez, O., Martínez, E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. Universidad de Granada. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Nutrición Hospitalaria. 21 (supl 2) pág. 1-14. (2006).
- ❖ Mendoza M, Calvo C. Bromatología composición y propiedades de los alimentos, McGraw-Hill Interamericana. Madrid., pág.13-14,55-61. (2010).
- ❖ Moughan, Paul J. Dietary protein quality in humans-An Overview. *Journal of AOAC International*;88 (3) pág.18-20.(2005).
- ❖ Nadal.S. Las leguminosas de grano en la agricultura moderna. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid., Pág. 36 y 37. (2004).
- ❖ Paredes, O., Guevara, F., Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas., Fondo de Cultura Económica ., México D.F., pag 54-81. (2006).

- ❖ Tolentino M.; Icochea D.; Reyna S.; Valdivia R. Influencia de la temperatura y humedad ambiental del verano e invierno sobre parámetros productivos de pollos de carne criados en la ciudad de Lima. Perú, Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú *versión impresa* ISSN 1609-9117 19: 9-14. (2008)
- ❖ Rodríguez R, Evaluación Bromatológica y determinación de los factores tóxicos naturales en el grano de frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*) verde y seco, consumido en el municipio de Cuetzalan Puebla., Tesis de la UNAM, México, D. F., Pág. 7-9, 69-86. (2009).
- ❖ Serrano, J. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca, Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 54(1): 1-11.(2004).
- ❖ Venegas, S. Elaboración de una base de datos de consulta referente a la calidad nutritiva proteica de diferentes alimentos de origen animal y vegetal., Tesis licenciatura de la UNAM, México, D. F., Págs. 6-27, 46-50. (2010).
- ❖ Verdalet G., I., Ojeda R., M. M. y Silva H., E. R., Diagnóstico alimentario y nutricional en familias mexicanas. Información Tecnológica, *versión impresa* ISSN0716-8756 Vol.12 pág: 5, 12-79. (2001)