

10
DeJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

MODIFICACION ENZIMATICA DE LA PROTEINA DE
POLLO PARA LA ELABORACION DE UNA FORMULA
PARA NIÑOS DESNUTRIDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

IDA PAOLA APPENDINI ALBRECHTSEN

SANDRA PEREZ MUNGUIA

TESIS CON
FALLA DE ORGEN

MEXICO, D.F.

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pags.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	4
III. GENERALIDADES	5
III.1 DESNUTRICION	5
III.1.1 Clasificación	6
III.1.2 Transtornos fisiológicos	11
III.1.3 Tratamientos dietéticos	14
III.2 EMULSIONES	28
III.2.1 Estabilidad	29
III.2.2 Emulsificantes	32
III.2.3 Estabilizantes	33
III.3 PROTEINAS MUSCULARES	35
III.4 HIDROLISIS ENZIMATICA	39
 PARTE EXPERIMENTAL	
IV. MATERIALES Y METODOS	43
IV.1 SUSTRATO	43
IV.2 ENZIMAS PROTEOLITICAS	44
IV.3 HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA PECHUGA DE POLLO	46

IV.4 PREPARACION Y EVALUACION DE LAS EMULSIONES	48
V. RESULTADOS Y DISCUSION	53
V.1 CARACTERIZACION DEL SUSTRATO	53
V.2 OPTIMIZACION DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA	54
V.2.1. Selección de enzimas	54
V.2.2. Solubilización de proteína	56
V.3 DESARROLLO DE LA FORMULA	60
V.4 EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES	63
V.5 ESCALAMIENTO DEL PROCESO	70
VI. CONCLUSIONES	76
VII. RECOMENDACIONES	78
IIX. BIBLIOGRAFIA	79
IX. ANEXOS	83

I. INTRODUCCION.

Los bajos recursos económicos de la población, las condiciones de insalubridad, la falta de educación, los factores culturales, así como las malas políticas alimentarias que con mayor frecuencia se presentan en países en vías de desarrollo, son las principales causas que ocasionan la desnutrición infantil.

México, es uno de los principales países afectados por este problema. En la última encuesta realizada por el Instituto Nacional de la Nutrición (Chávez, 1990), se publicó que el 50% de los niños menores de 5 años que habitan en el área rural están desnutridos, de los cuales, el 11.3% lo están de forma aguda y el 15% en forma severa. En la zona urbana, existe entre 7 y 17% de desnutrición en los niños, lo que indica una mejor situación alimentaria de los niños de ciudad, pero la cifra no es satisfactoria. Estas estadísticas son alarmantes, y si se comparan con estadísticas de hace 15 años, las cifras son comparables, pero con la diferencia de que actualmente hay más casos de desnutrición severa (7.5% en 1974 y 15% en 1989).

Estudios realizados por la Organización Panamericana de la Salud en Latinoamérica (Sepúlveda, 1988), demuestran que la diarrea es la causa principal de muerte en niños menores de cinco años, y la desnutrición está directamente relacionada con ella.

La desnutrición, puede provocar diarrea y la diarrea de origen infeccioso, puede también, a su vez, conducir a la desnutrición.

La forma más indicada de romper el círculo diarrea- desnutrición es mediante la rehidratación corporal seguida de una terapia nutricional del paciente. Diversos grupos de investigación en el mundo, han desarrollado fórmulas y dietas infantiles a fin de lograr una pronta recuperación.

Las fórmulas son de lo más diversas y su composición y elaboración se ha basado en la disponibilidad de alimentos en la población, su costo, la edad y el cuadro patológico que el niño presenta. Dentro de las fórmulas que más se emplean encontramos diluciones progresivas de leche, dietas elementales, hidrolizados proteínicos, fórmulas de soya y dietas a base de carne (Kempe, 1983).

El Departamento de Gastroenterología y Nutrición del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" estudia fórmulas a base de proteína de pollo como una alternativa para sustituir las dietas elementales un costo muy alto y que son empleadas actualmente en el hospital. Nurko y García Aranda, investigadores de este departamento, en un estudio reciente adaptaron y administraron una dieta a base de pollo, sacarosa y aceite demaíz a niños desnutridos desde las etapas iniciales de su tratamiento. Con la fórmula se obtienen respuestas satisfactorias por parte de los pacientes (Nurko, 1990).

El éxito de ésta fórmula en la práctica clínica (Nurko, 1993), aunado a la disponibilidad y al costo relativamente bajo de las materias primas, así como al hecho de ser también una opción para niños intolerantes a la lactosa y a las proteínas de la leche o

de la soya, hacen de esta fórmula una buena opción para el tratamiento de niños con desnutrición y diarrea crónica.

Sin embargo, en la práctica la fórmula presenta algunos problemas técnicos que dificultan su uso apropiado. Uno de ellos, es la obstrucción de las sondas cuando el alimento se suministra por vía enteral. Otro problema es la inestabilidad de la emulsión que causa una separación de fases. Los altos valores de osmolaridad de ésta dieta son también un posible inconveniente que agudizaría el cuadro diarréico, por lo que debe ser modificada.

II. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Estabilizar una fórmula para niños desnutridos a base de proteína de pollo, aceite de maíz y sacarosa.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Realizar una hidrólisis enzimática de la proteína de pollo, a fin de mejorar sus propiedades funcionales y utilizar un agente emulsificante, de forma tal que permitan formar una emulsión estable con los componentes de la dieta.**
- Elegir las mejores condiciones de hidrólisis de la proteína de pollo para obtener hidrolizados cuyas emulsiones sean estables.**
- Obtener un producto en polvo de fácil manejo y rehidratación, mediante un proceso de homogenización y secado por aspersión a nivel planta piloto.**

III. GENERALIDADES.

III.1. DESNUTRICION.

En zonas pobres, el problema de desnutrición-diarrea es grave, debido a la poca disponibilidad de alimentos y a las malas condiciones de higiene a las que la población está expuesta.

La baja disponibilidad y la escasa variedad de alimentos hace que el consumo de nutrimentos de la población sea inadecuado, causando diversos grados de desnutrición. Esta desnutrición puede tener su origen en la madre, que al amamantar al niño, no le proporciona la cantidad y/o calidad de leche que se requiere durante la lactancia. El proceso de desnutrición continúa generalmente después del destete, cuando la leche materna se sustituye por dietas que no satisfacen las necesidades calórico-proteínicas del niño.

Es común que los niños desnutridos presenten diarreas agudas o crónicas, ya que el sistema inmunológico se ve disminuído, quedando altamente susceptible a otro tipo de infecciones. Así mismo pueden presentarse problemas de absorción intestinal e intolerancia a ciertos alimentos.

Por otro lado, las condiciones insalubres que se dan en algunos lugares apartados permiten la proliferación de microorganismos en los alimentos, que al ser ingeridos agravan los procesos de infección diarreica la cual contribuye a empobrecer aún más la dieta a través de la anorexia, aumentando los requerimientos nutricionales y haciendo así más severas las deficiencias alimentarias (Mora, 1983).

El problema es sumamente grave: en 1982 el porcentaje de defunciones por diarrea en México fué del 56.35 % del total de defunciones en lactantes (Kumate, 1988).

III.1.1. CLASIFICACION.

Se puede definir a la desnutrición como la asimilación deficiente de nutrimentos , que conduce a un estado patológico de distintos grados de severidad y manifestaciones clínicas.

Gómez (1946) clasificó a la desnutrición en tres grados, basándose en el peso corporal para su edad:

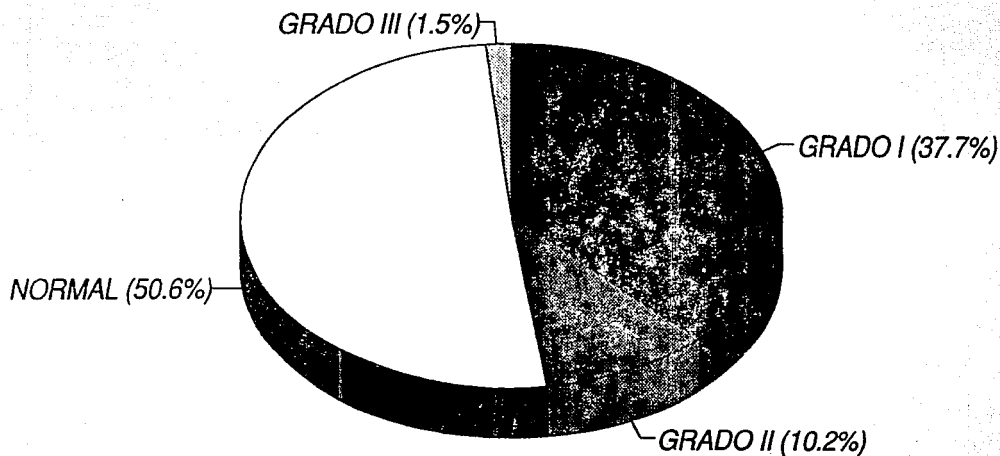
Desnutrición de primer grado: cuando se presentan pérdidas de peso no mayores del 25 % del peso normal.

Desnutrición de segundo grado: cuando la pérdida de peso fluctúa entre 25 y 40% del peso normal.

Desnutrición de tercer grado: cuando la pérdida de peso rebasa el 40% del peso normal.

Esta clasificación es aceptada mundialmente y es la que se utiliza con mayor frecuencia en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" para diagnosticar el estado nutricional de los pacientes que ingresan. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta otros factores como son la composición corporal y crecimiento y desarrollo físico. Algunos autores han realizado propuestas interesantes en base a esto para lograr una más fácil comparación somatométrica entre diferentes grupos de pacientes (Ramos, 1977).

*ESTADO DE NUTRICION DE LA POBLACION MENOR DE 5 AÑOS
DISTRIBUCION SEGUN LA CLASIFICACION DE GOMEZ
NIVEL NACIONAL (1989)*



La desnutrición afecta principalmente a niños menores de 5 años, a las mujeres embarazadas y a mujeres amamantando.

De acuerdo a la clasificación de Gómez, en México el 50 % de la población infantil menor de 5 años se encontraba en estado de desnutrición en 1989 (Fig.1). En los niños la desnutrición de tercer grado es una de las causas más frecuentes de mortalidad y morbilidad infantil en países subdesarrollados ya que se presentan deficiencias calórico-proteínicas, lo que trae como consecuencia las siguientes características dentro de los primeros años de vida (Frenk, 1989):

1. Disminución de actividad física.
2. Velocidad de crecimiento lenta.
3. Transtornos en el sistema inmunológico.
4. Morbilidad.
5. Mortalidad.

Al disminuir la asimilación de los nutrimentos, el crecimiento puede no verse afectado y mantenerse a expensas de la actividad física, que requiere de un gasto de energía. Cuando la desnutrición es más avanzada, se manifiesta en dos formas: marasmo y kwashiorkor. El marasmo se expresa como una enfermedad crónica y se presenta generalmente durante el primer año de vida. Los niños se adaptan a su condición de desnutrición y llegan a sobrevivir, incluso a infecciones graves. Las características que se presentan son : retardo

en el crecimiento, pérdida de peso, pérdida de músculo, pérdida de grasa subcutánea, hepatomegalia, actitud alerta, hambre, gastroenteritis, infecciones respiratorias, anemia, mayor respuesta a la adrenalina, disminución de la hormona de crecimiento, disminución de insulina, aumento de lipoproteínas y función renal alterada.

El kwashiorkor se presenta en niños de uno a cuatro años de edad, los cuales durante la lactancia fueron bien nutridos y después recibieron dietas deficientes, de baja calidad, mal balanceadas o contaminadas, que provocaron la desnutrición. A raíz de esto los niños presentan diarreas graves y otro tipo de enfermedades infecciosas, lo que conduce a una disminución de las proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina. Presentan acumulación de agua en los tejidos, lo que se conoce como edema. Otras características del kwashiorkor son : retardo de crecimiento, pérdida de masa muscular, acumulación de grasa subcutánea, hepatomegalia, hígado graso, xerofalmia, malabsorción, disminución de insulina, cambios de pigmentación en piel y cabello (McLaren, 1983).

Otro tipo de desnutrición es el llamado kwashiorkor marasmático, en el cual los niños consumen el exceso de grasa acumulada en mejillas y abdomen pero siguen presentando edema.

En lo que respecta a la diarrea , ésta es multicausal y se ha definido como un incremento en la frecuencia de deposiciones líquidas o semilíquidas en relación al patrón usual de cada individuo. Esta se puede clasificar según su duración en aguda y crónica.

La diarrea aguda es aquella que dura 7 días o menos. La diarrea crónica es el paso de tres o más evacuaciones anormales diarias por más de dos semanas (Coello, 1988) (Lanata, 1988).

III.1.2. TRANSTORNOS FISIOLÓGICOS.

Los niños con desnutrición y diarrea crónica se caracterizan por presentar deshidratación y posteriormente malabsorción de nutrientes. Padecen además, de infecciones virales, bacterianas y parásitos, ya que el sistema inmunológico se ve afectado, así como de insuficiencia pancreática e intolerancia a proteínas y carbohidratos, principalmente.

Se ha visto en algunos estudios que el nivel de amilasa salival disminuye en la desnutrición. El jugo gástrico, también se ve reducido, lo que implica una menor protección contra microorganismos patógenos. El páncreas se vuelve fibroso y presenta vacuolas en el citoplasma de las células acinares, alterando su funcionalidad como secretor de enzimas indispensables para el desdoblamiento de los alimentos.

La motilidad del intestino se ve afectada por cambios en el nivel de serotonina y adrenalina. En el niño con marasmo, disminuye la altura de las vellosidades de la mucosa intestinal, reduciéndose así, la superficie de absorción.

En condiciones normales, el intestino contiene en el borde de cepillo, disacaridasas que hidrolizan carbohidratos obteniendo como productos glucosa, galactosa y fructosa. La glucosa y la galactosa, se absorben por medio de transporte activo, a través de la bomba sodio potasio, mientras que la fructosa se absorbe por difusión simple. De éstas disacaridasas, la más afectada al existir un cuadro de desnutrición es la lactasa. Por encontrarse en la parte más superficial del borde de cepillo del intestino, su concentración es menor que las otras enzimas y se ve limitada aún en la desnutrición de primer grado. Al ser deficiente la lactasa, la lactosa no es hidrolizada y ejerce una presión osmótica elevada dentro del intestino produciendo diarrea. Por otro lado la lactosa es fermentada por los microorganismos del intestino grueso a ácido láctico causando irritación de la mucosa y problemas de flatulencia, dolor abdominal, distensión, etc. (Romer, 1983).

Los aminoácidos o péptidos que se forman a partir de la hidrólisis enzimática de las proteínas, necesitan de una concentración elevada de sodio en las células epiteliales de la mucosa intestinal para ser absorbidos y transportados hasta el torrente sanguíneo.

Las enzimas que intervienen en la hidrólisis de las proteínas son: la pepsina, que es secretada en el estómago; los precusores de la tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa, que son secretadas en el páncreas; aminopeptidasas y dipéptidasas de la mucosa intestinal.

Se ha visto que la absorción de hidrolizados proteínicos (constituidos por péptidos pequeños) es mayor a su equivalente (en términos de nitrógeno) de mezclas de a.a. libres

(a molaridades elevadas), sugiriendo que el sistema de transporte de péptidos es de gran importancia nutricional. Con base a estos resultados se ha propuesto que las dietas enterales químicamente definidas, incluyan péptidos de cadena corta en vez de a.a. libres (Hegarty, 1982).

Los lípidos, durante el proceso digestivo, son hidrolizados principalmente por la lipasa pancreática para formar ácidos grasos y monoglicéridos, que se absorben a través de la mucosa por diversos mecanismos según su peso molecular. Para que la lipasa pancreática actúe sobre los lípidos, estos deben ser emulsificados por sales biliares provenientes del hígado. En condiciones normales, las sales biliares se desconjugan en el colon e ileon terminal, pero en el caso de infecciones, la población bacteriana presente en el duodeno y el yeyuno desconjuga a los ácidos biliares en la parte superior del intestino evitando la formación de las micelas y disminuyendo así la absorción de las grasas. Además, los ácidos biliares desconjugados dañan a las microvellosidades de la mucosa (Ganong, 1974).

Se ha visto también que la secreción de lipasa disminuye en la desnutrición por daño al páncreas.

Se presenta también estatorrea (presencia de un exceso de grasa en las heces), consecuencia de la malabsorción de lípidos. La absorción defectuosa de grasas trae como consecuencia que las vitaminas liposolubles no se absorban en cantidades suficientes.

El aprovechamiento de otros nutrimentos como son vitaminas hidrosolubles y minerales se ven directamente afectados por la malabsorción de carbohidratos, proteínas y grasas ya que sus mecanismos de transporte y absorción son dependientes de estos procesos (Kleinman, 1989).

Así mismo las infecciones bacterianas que acompañan muchas veces a la desnutrición, provocan un aumento en el catabolismo. Se ha calculado que por cada grado de fiebre, existe un aumento del 5 al 8 por ciento del metabolismo basal (Sepúlveda, 1988).

III.1.3. TRATAMIENTOS DIETETICOS.

La deshidratación es la causa más importante de mortalidad en niños que presentan diarrea, y por lo tanto lo primero que hay que mantener es el balance de agua, de electrolitos y el equilibrio ácido-base. Es por esto que la Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de una solución de glucosa y electrolitos (suero oral) , que debe administrarse al paciente según el grado de deshidratación que presenta. Se aplica por vía oral en la mayoría de los casos a excepción de casos agudos donde se utiliza la vía endovenosa (Pizarro, 1988).

El manejo oportuno y adecuado del niño con deshidratación, así como su prevención, disminuye significativamente las tasas de mortalidad.

El tratamiento clínico del niño terminada su hidratación es de suma importancia y conocer primero las causas que desencadenaron la diarrea es de utilidad para poder controlarla de forma efectiva.

El paso a seguir es alimentar al niño. No hay razón alguna de suprimir por completo la alimentación por vía enteral.

Si existe anorexia se recomienda proporcionar alimento en pequeñas dosis sin dejar de suministrar suero hasta que desaparezca la diarrea. No es recomendable suprimir la alimentación materna. La leche humana ofrece el "factor bífidus", el cual propicia el crecimiento de Lactobacillus bífidus, bacteria que produce a partir de la lactosa, un incremento de la acidez en el intestino, evitando así la colonización de las bacterias patógenas. Así mismo el contenido de las inmunoglobulinas en la leche, especialmente la IgA, proporcionan defensas contra las infecciones (Badui, 1981). Sin embargo existen casos que presentan una aguda intolerancia a la lactosa, lo que hace que en ocasiones la leche materna no sea la alternativa más adecuada.

La alimentación puede ser oral o parenteral en niños hospitalizados y depende de la gravedad de la enfermedad. Sin duda la alimentación enteral es más sencilla y se ha demostrado que se aprovechan con mayor eficiencia los nutrimentos. La alimentación

parenteral es sólo recomendable cuando por la vía enteral no es accesible como es el caso de estados muy avanzados de desnutrición, diarrea prolongada, infecciones gastrointestinales e intolerancia a todos los carbohidratos. Sin embargo, presenta desventajas ya que requiere del equipo, personal e instalaciones adecuadas, lo que eleva el costo del tratamiento (Coello, 1976).

Tanto la vía enteral como la parenteral hacen uso de las llamadas dietas elementales o químicamente definidas. Existen varias dietas elementales comerciales (Vega, 1988). En México, la más empleada es Vivonex (Norwich Pharmacal), formulada a partir de agua, glucosa, electrolitos y aminoácidos que aportan la energía y proteínas necesarias para contrarrestar el balance negativo ocasionado por la situación hipercatabólica del paciente. Dada su elevada osmolaridad, se dosifica en diluciones progresivas hasta alcanzar concentraciones del 20%, por lo que al inicio del tratamiento no se cubren los requerimientos calóricos y protéicos que el niño necesita (Vega, 1982).

A pesar de esto, diversos estudios (Coello, 1976; Vega, 1982; Vega, 1988; Larracilla, 1989) muestran que se obtiene ganancia de peso sobre todo en niños con edema, mas no así en niños con marasmo en los cuales se obtiene mejor respuesta cuando se inicia el tratamiento con un aporte energético mayor. Otra desventaja es que la dieta debe suplementarse con vitaminas, elementos traza y ácidos grasos esenciales adicionales, además resulta ser una dieta demasiado cara (N\$ 2600/ Kg proteína, 1993).

La leche de vaca es otra alternativa utilizada muy frecuentemente y se utiliza en una dilución al 50 %. Se adiciona de sacarosa, y si es tolerada, se aumenta progresivamente la concentración (García Aranda, 1988). Desgraciadamente, los niños con desnutrición proteínico-calórica, no toleran la leche por sus problemas del malabsorción, reincidiendo la diarrea, ya sea por intolerancia a la lactosa y/o a las proteínas de la leche.

Dadas las desventajas de una dieta elemental y el problema que representa la lactosa en leche de vaca o materna para estos niños, se han buscado alternativas para sustituirlas al formular dietas de bajo costo, completas, efectivas y aceptadas culturalmente. La gama de fórmulas y dietas que se han empleado y se emplean actualmente es inmensa y dependen en gran medida de la disponibilidad y costos de los alimentos de cada país. Existen desde dietas que consisten en mezclas de alimentos que proporcionan los distintos nutrimentos hasta fórmulas muy específicas (Fomon, 1976; Kempe, 1983).

En los años cincuentas se lanzaron al mercado en EUA las dietas libres de lactosa a base de harina de soya, dirigidas especialmente a niños intolerantes y más tarde se emplearon en el tratamiento de niños desnutridos. Estas fórmulas fueron modificadas en los años sesentas, presentando mejor aceptación. Se sabe que la proteína de soya genera un crecimiento satisfactorio en lactantes desnutridos alimentados con ProSobee (Mead-Johnson), que es una fórmula de harina de soya, aumentando la concentración de albúmina y elevando significativamente el peso cuando se compara con dietas a base de leche. Otras dietas a base de soya son: Isomil (Lab. Ross), y Nursoy (Mead-Johnson). En México, la

soya se encuentra poco disponible y su costo es elevado.

Se han utilizado también desde hace muchos años mezclas de cereales y leguminosas. En México, un estudio comparativo entre fórmulas a base de leche y soya-avena mostraron resultados satisfactorios en el tratamiento de desnutrición y diarrea crónica (Del Valle, 1980). Así mismo, se han realizado estudios de fórmulas a base de garbanzo, las cuales han mostrado balances de nitrógeno positivos y un valor biológico similar al de la soya en el tratamiento de niños con diarrea severa (Sotelo A. et.al., 1987).

Los caseinatos así como sus hidrolizados, se emplean como fuente de proteínas, pero su costo es elevado. Graham y col. tuvieron éxito con el uso de Portagen (Mead-Johnson) en niños con kwashiorkor y de Pregestimil (Mead-Johnson) en niños con marasmo, diarrea e infección grave asociados (Fomon, 1976). Otra fórmula disponible en el mercado es Nutramigen (Mead-Johnson).

Los tratamientos clínicos de niños desnutridos con diarrea crónica que emplean una dieta hecha a partir de hidrolizado de lactoalbúmina han sido bien tolerados y la respuesta a este tipo de hidrolizado es rápida (Mendoza, 1987). En situaciones extremas donde el paciente es intolerante tanto a la lactosa como a las proteínas de la leche y soya, una alternativa es el uso de fórmulas a base de carne. Las fórmulas a base de carne animal han sido estudiadas desde hace muchos años (Sisson, 1951). Estas fórmulas proporcionan proteínas de buena calidad. A diferencia de la mayoría de las proteínas de origen vegetal,

las proteínas de origen animal presentan un alto contenido de aminoácidos indispensables que deben de ser ingeridos en la alimentación diaria en proporciones bien determinadas (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Contenido de aminoácidos indispensables en algunos alimentos.*
(Gramos de aminoácidos por 100 g de proteína)**

Alimento	Lys	Isoleu	Treo	Val	Leu	Trip	Met	Fen
Leche de vaca	7.78	5.54	4.52	6.32	9.68	1.40	2.48	5.12
Carne de res	8.73	5.23	4.41	5.55	8.19	1.16	2.48	4.11
Carne de cerdo	9.60	5.30	4.30	5.70	8.60	1.17	2.50	4.00
Carne de pollo	7.95	5.34	3.97	5.09	7.36	1.02	2.51	4.00
Soya	6.54	5.10	3.94	5.20	7.87	1.31	1.26	4.87
Garbanzo	6.48	5.46	3.50	4.66	9.80	1.10	0.30	4.90
Trigo	2.76	4.17	2.89	4.59	6.70	1.25	1.52	4.87
Maiz	2.84	4.43	3.90	5.06	12.89	0.62	1.87	4.61

* Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Pub. L-12. Instituto Nacional de Nutrición.

A pesar de que existen diversos estudios sobre las fórmulas a base de carne, comercialmente la más empleada es la fórmula a base de carne (M.B.F., Gerber), que se prepara de corazón de ternera con grasa (aceite de sésamo) y carbohidratos (sacarosa y almidón de tapioca) (Kempe, 1983).

Entre las fuentes de proteína animal se encuentra el pollo, que es de interés por presentar un costo menor comparado con la carne de otras especies (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de precios entre fuentes de proteínas.*

Fuente	Costo (N\$)/Kg Proteína
Carne de cerdo magra	75.0
Carne de res magra	67.5
Pechuga de pollo deshuesada y sin piel	57.0
Leche entera de vaca	46.0
Proteína de soya	44.0

* Costos estimados en Marzo de 1993.

La proteína de pollo tiene un buen valor nutricional pues contiene aminoácidos indispensables en cantidades apropiadas para la alimentación humana (Cuadro 1). Como cualquier carne de origen animal, es una buena fuente de vitaminas del complejo B y hierro y proporciona cantidades considerables de niacina (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 3. Recomendaciones diarias de Niacina, Hierro, Vitamina B1 y Vitamina B2.*

Edad (años)	Peso (Kg)	Talla (cm)	Niacina (mg)	Hierro (mg)	Vit. B1 (mg)	Vit B2 (mg)
Lactantes						
0-0.5	6	60	6	10	0.3	0.4
0.5-1	9	71	8	15	0.5	0.6
Niños						
1-3	13	90	9	15	0.7	0.8
4-6	20	112	11	10	0.9	1.0
7-10	28	132	16	10	1.2	1.4

* Food and Nutrition Board. RDA 9th.ed. Nat. Acad. of Sciences. Washington, 1980.

Cuadro 4. Contenido de Hierro, Niacina, Vitamina B1 y B2 en 100 g de porción comestible. *

Alimento	Hierro (mg)	Niacina (mg)	Vit. B1 (mg)	Vit. B2 (mg)
Leche entera de vaca	-	0.10	0.03	0.17
Leche de soya	0.8	0.20	0.08	0.03
Carne de res cocida	3.3	4.00	0.05	0.20
Pechuga de pollo cocida	1.3	11.60	0.04	0.10

* Composition of foods. Agriculture Handbook No.8. USDA, 1975.

El análisis bromatológico del pollo (Cuadro 5) depende de muchos factores como el tipo de alimentación, la edad y el sexo. La mayoría de los ácidos grasos que contiene son monoinsaturados (Stadelman, 1988).

Cuadro 5. Composición de pechuga de pollo cruda (g por 100 g de porción comestible).*

Humedad	65.99
Calorías	215 Kcal
Proteína	18.60
Lípidos	15.06
Carbohidratos	0.000
Fibra	0.000
Cenizas	0.799

* W.J. Stadelman, V.M. Olson.,G.A. Shemwell, S. Pasch. Egg and poultry meat processing. VCH,1988. P.95.

En México, se han realizado estudios sobre el uso de pechuga de pollo en el tratamiento de niños con diarrea por intolerancia a la lactosa (Coello, 1980). Un estudio reciente muestra que una mezcla de pollo-harina de maíz nixtamalizada (50:50) presenta una buena calidad de proteína, similar al de la pechuga, además de ser una fórmula barata (Appendini, 1992).

Romer (1982) reporta una fórmula infantil a base de carne de pollo (Cuadro 6), la cual cubre los requerimientos calórico-proteínicos del niño pues aporta 752 Kcal/l y 2.34 g de proteína/100 ml. Así mismo Romer llevó a cabo una comparación de los aminoácidos indispensables de la leche materna y la leche de vaca, encontrándose valores muy similares (Cuadro 7).

Cuadro 6. Concentrado de pollo.*

Pollo	100 g
Aceite de maíz	20 ml
Glucosa	100 g
Agua c.s.p	1000 ml

* Romer H. GEN. Vol. 36. No.1. 1982. p. 117.

Cuadro 7. Contenido de aminoácidos indispensables en la leche materna, leche de vaca y concentrado de pollo. (Gramos de aminoácidos por 100 gramos de nitrógeno)*.

	Leche materna	Leche de vaca	Carne de pollo
Histidina	13.8	20.3	18.0
Isoleucina	34.4	29.4	33.0
Leucina	56.7	51.2	45.2
Lisina	41.3	45.2	54.9
Metionina	12.8	9.0	15.6
Fenilalanina	27.2	32.8	24.6
Treonina	28.4	29.6	26.6
Triptófano	10.3	8.5	7.6
Valina	39.1	31.2	30.7

* Romer H. GEN. Vol. 36 No.1. 1982. p. 118.

Esta fórmula presenta algunas desventajas como una alta osmolaridad (495 mOsm/l) y una baja concentración de calcio (1.1 mg/l).

Posteriormente Romer (1991) realizó también estudios de otra fórmula de pollo y la comparó de nuevo con la leche de vaca, y observó su efecto sobre la diarrea aguda. Los niños tratados con la fórmula respondieron positivamente, mientras que los alimentados con leche recaían con diarrea por intolerancia a la lactosa y algunos por intolerancia a las proteínas mismas de la leche.

En el Hospital Infantil de México, se realizó un estudio de balance de nitrógeno empleando 3 fórmulas en forma sucesiva para el tratamiento de niños desnutridos convalecientes de diarrea (Herrera, 1987). Una de las fórmulas que se emplearon fue elaborada a partir de pechuga de pollo semejante a la propuesta por Romer, pero con un aumento del 1% de la concentración de grasa (Cuadro 8). La glucosa se sustituyó por sacarosa y se adicionaron algunas sales minerales. El aporte energético de la fórmula fue de 79 Kcal/100ml. Los resultados del estudio indicaron balances de nitrógeno positivos empleando la dieta de pollo una vez que los niños se recuperaban con la dieta elemental.

Cuadro 8. Contenido de una fórmula preparada con carne de pollo.*

Pechuga de pollo s/piel	100.0 g
Aceite de maíz	30.0 ml
Sacarosa	80.0 g
Cloruro de potasio	2.5 g
Cloruro de sodio	1.0 g
Fosfato de calcio	1.0 g
Agua (csp)	1000.0 ml

Composición de nutrimentos por 100 ml.*

Proteína (g)	3.2
Grasas (g)	3.6
Carbohidratos (g)	8.0
Sodio (mg)	43.7
Potasio (mg)	100.2
Calcio (mg)	101.3
Fósforo (mg)	89.0
Cloruro (mg)	86.9
Calorías	79.0

* Herrera-Anaya, Vega Franco. Bol.Med.Hosp.Infan.Mex.Vol.44.No.4. 1987.p.209.

Con base a la fórmula propuesta por Romer y a los resultados obtenidos en el estudio anterior, los médicos Nurko y García Aranda (1990), también del Hospital Infantil de México, realizaron un estudio clínico posterior, en el cual emplearon una dieta de pollo en forma transicional para el tratamiento de niños con desnutrición grave y diarrea crónica (Cuadro 9). La fórmula se administró por vía nasogástrica a 150 ml/ Kg de peso a goteo continuo en diluciones progresivas, iniciando a una concentración de 3.5 % y avanzando a 8 % (basados en g de pollo) en el transcurso de una semana, a ocho niños marasmáticos; luego se administró la fórmula a la última dilución por otra semana. A ésta dilución la fórmula presentó una densidad calórica de 84.8 Kcal/100 ml.

Cuadro 9. Composición de formulas transicionales .

	I	II	III	IV	V
Carne de pechuga (g/dl)	3.5	4.5	5.0	6.0	8.0
Aceite de maiz (g/dl)	1.5	2.0	2.5	3.0	3.0
Sacarosa (g/dl)	4.5	6.0	6.5	8.0	10.6
Proteína (g/dl)	1.2	1.5	1.7	2.0	2.6
Carbohidratos (g/dl)	4.5	6.1	6.6	8.1	10.7
Lípidos (g/dl)	1.7	2.3	2.8	3.4	3.5
Calcio (mg/dl)	28.3	33.1	37.8	42.6	47.4
Fósforo (mg/dl)	25.6	31.0	36.0	42.0	47.1
Magnesio (mg/dl)	10.4	12.6	14.7	16.9	18.2
Energía (Kcal/dl)	38.4	50.8	58.4	70.8	84.8

Los resultados demostraron ganancias de peso, un balance de nitrógeno fué positivo y un porcentaje de absorción de nitrógeno fué en promedio, de 92.2. El valor biológico fué de 80.7 %, el coeficiente de absorción de grasa fué de 96 % y se obtuvo un aumento de la albúmina sérica de los pacientes. Sin embargo estos resultados no son del todo representativos ya que el tamaño de la población estudiada fué pequeña (ocho niños marasmáticos y con diarrea crónica). Sin embargo, la importancia nutricional y económica que la fórmula representa, ha dado lugar a un mercado de interés por parte del Hospital Infantil para seguir las investigaciones en ésta línea.

La tendencia actual de los investigadores asociados a este proyecto es emplear la fórmula más concentrada en lugar de administrarla de forma transicional, pues los niños requieren un mayor aporte energético. Otra modificación a considerarse, es el aumento

en el contenido de grasa; algunos estudios han demostrado resultados positivos al aumentar la grasa en dietas para lactantes, contribuyendo a un mayor aporte energético (Jirapinyo, 1990).

El objetivo primario de la presente tesis como se mencionó anteriormente consiste en estabilizar los componentes de la formulación mediante una hidrólisis enzimática de la proteína de pollo para lograr una modificación de sus propiedades funcionales y la formación de una emulsión estable. Una emulsión en este punto será la que nos permitirá obtener un polvo, que una vez rehidratado sea estable. Es por tanto interesante revisar en este escrito la naturaleza de las emulsiones y los cuidados más importantes en su producción y manejo.

III.2. EMULSIONES.

Una emulsión es un sistema heterogéneo constituido por dos líquidos inmiscibles. Uno de los líquidos forma la fase continua o dispersante, mientras que el otro se encuentra en forma de pequeñas gotas cuyo diámetro, varía entre 0.1 y 5 micras y constituye la fase dispersa.

Las emulsiones líquidas se clasifican en emulsiones de aceite en agua (o/w), como por ejemplo la leche, donde la fase dispersa son los glóbulos de grasa y la fase continúa es agua; emulsiones de agua en aceite (w/o), como lo es la mantequilla. En el área de alimentos, existen las llamadas emulsiones cárnicas que corresponden a un sistema más complejo en donde la fase dispersa es la grasa y la fase continúa es una matriz acuosa compuesta por sales, protefínas, fibras musculares y tejido conectivo.

Generalmente, las propiedades físicas que presenta una emulsión, son las mismas de la fase continúa, por ejemplo, una emulsión o/w, conduce la electricidad, es de secado rápido y se diluye en agua. La formación de una emulsión requiere de un gasto energético constituye parte del trabajo requerido para formar la interfase alrededor de cada partícula. La distribución de tamaño de partícula de una emulsión está afectado por el tipo de homogenizador empleado.(Fennema,1985; Charalambous, 1989).

III.2.1. ESTABILIDAD.

La estabilidad es la característica más importante de una emulsión, ya que de ésta depende la apariencia y aceptación de la misma.

La base para lograr la estabilidad de una emulsion está en el balance que existe entre las fuerzas de atracción de Van der Waals y las fuerzas de repulsión electroestáticas. Las fuerzas de atracción tienden a desestabilizar la emulsión, mientras que las de repulsión la estabilizan, ya que impiden la coalescencia o agregación de las partículas componentes

de la fase dispersa. Si las fuerzas de repulsión son mayores a las de atracción, la emulsión tiende a ser estable.

Otros factores que intervienen en la estabilidad de la emulsión son:

- **La tensión interfacial.** Es el trabajo necesario para incrementar el área de contacto entre las fases que forman la emulsión; los compuestos que reducen la tensión en interfases, reducen la energía necesaria para formar la emulsión, dando como resultado un sistema más estable.
- **El tipo y características de algún compuesto que se adsorba en la interfase.**
- **Tamaño y relación superficie-volumen de los glóbulos dispersos.**
- **Relación peso-volumen de la fase continua y discontinua.**
- **La viscosidad de la fase continua.**

En las emulsiones aceite en agua, se presentan tres diferentes mecanismos que desestabilizan la emulsión que son los siguientes:

Cremado.

Se refiere a la separación de las partículas de la emulsión por diferencia de densidad con el medio que las rodea, ascendiendo a la superficie para formar una zona rica en partículas grasas, más no está constituida por la parte oleosa libre. El cremado se da generalmente en soluciones concentradas de 10 a 50% y cuando el tamaño de glóbulos

grasos es superior a 2 micras. El cremado obedece a la ley de Stokes, que plantea que la velocidad de sedimentación de una partícula esférica en un líquido está dada por:

$$V = \frac{2gr^2 (d_1 - d_2)}{9n}$$

donde:

V= velocidad de sedimentación
g= aceleración de la gravedad
r= radio de la gota
d₁= densidad de la esfera
d₂= densidad del líquido
n= viscosidad del líquido

Floculación.

En este fenómeno las gotas dispersas forman agregados debido a la atracción de sus cargas eléctricas superficiales. Las gotas agregadas prevalecen intactas sin afectar su membrana. La floculación ocurre cuando el tamaño de partícula es menor a 1 micra y las soluciones son concentradas en cantidades menores del 5 %.

Coalescencia.

Consiste en la combinación de agregados formados en la floculación para dar como resultado gotas unitarias de mayor tamaño. Es la forma más importante de desestabilización de una emulsion, ya que la capa interfacial que rodea a los glóbulos grasos se adelgaza y se rompe, dándole carácter irreversible al proceso y da como resultado la desemulsificación completa.

La estabilidad de una emulsión también se ve afectada por cambios de temperatura, campos eléctricos, pH, fuerza iónica o daños mecánicos.

III.2.2. EMULSIFICANTES.

Para lograr una emulsion estable, se puede hacer uso de agentes tensoactivos que dada su naturaleza anfifílica se concentran en la interfase favoreciendo la interacción entre los dos líquidos.

Para determinar el emulsificante adecuado para un alimento, es necesario conocer su solubilidad. Griffin introdujo el término HLB (balance hidrófilo-lipofílico) basado en consideraciones empíricas. Es una medida de la afinidad que tiene el emulsificante por la fase acuosa o la fase lipídica dependiendo de la relación en porcentaje que existe entre sus

grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. La escala de HLB abarca valores del 1 al 20. Mientras más altos son estos valores el emulsificante es más hidrofílico. Existen otros criterios para escoger un emulsificante, que consideran las características químicas de las fases, los componentes disueltos en éstas así como la temperatura (Fennema, 1985).

Los emulsificantes empleados en alimentos también se clasifican en: aniónicos, catiónicos, no iónicos, anfólicos y emulsificantes insolubles en agua. Su uso dependerá de la naturaleza química de la emulsión, de su disponibilidad y del costo.

Para la elaboración de alimentos infantiles, el único emulsificante permitido es la lecitina, por ser un emulsificante natural (Codex Alimentarius, 1981); se obtiene comercialmente del frijol de soya y es una mezcla de fosfatidilecolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidil inositol, además de pequeñas cantidades de triglicéridos, ácidos grasos y carbohidratos.

II.2.3. ESTABILIZANTES.

Además de los agentes emulsificantes, se pueden estabilizar emulsiones utilizando de macromoléculas y/o sólidos finamente divididos suspendidos en la fase continua.

Las partículas sólidas de tamaños similares a las gotas de aceite dispersas pueden estabilizar las emulsiones mediante su adsorción en la interfase, formando una barrera física alrededor de las gotas y evitando así el contacto entre ellas. La estabilidad de estas

emulsiones depende de la capacidad de las dos fases para retener las partículas sólidas.

Los polisacáridos y las proteínas son capaces de formar capas alrededor de las gotas dispersas formando una barrera física e impidiendo la coalescencia. En el caso de las proteínas, el efecto de estabilización depende principalmente de las propiedades reológicas y espesor de la capa de proteína y de factores fisicoquímicos intrínsecos como la composición y secuencia de aminoácidos, su peso molecular, la conformación y distribución de las cargas electrostáticas de la molécula.

Como la mayoría de las proteínas usadas en los sistemas alimentarios son solubles en agua, estabilizan mejor las emulsiones aceite en agua. Las proteínas capaces de ionizarse incrementan las fuerzas de repulsión electrostáticas aumentando así la estabilidad de la emulsión. Para comparar las propiedades de emulsificación de diferentes proteínas se aplican principalmente dos pruebas que son: capacidad de emulsificación (EC) y estabilidad de la emulsión (ES) (Fennema, 1985).

La capacidad de emulsificación se define como:

EC = ml de aceite emulsificados / g de proteína

Cuando la proteína ya no es capaz de emulsificar más aceite, ocurre una inversión de fases, la cual se detecta por el súbito cambio en la viscosidad, cambio en el color (si existe algún colorante presente) o con el incremento en la resistencia eléctrica.

La estabilidad de la emulsión se expresa como:

$$ES = \text{volumen final de emulsión} \times 100 / \text{volumen inicial de emulsion}$$

Las dos pruebas mencionadas reflejan el hecho de que las proteínas llevan a cabo dos funciones: ayudan a la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial y ayudan a estabilizarla al formar una barrera física en la interfase.

Las proteínas en su punto isoelectrico son escasamente solubles y no contribuyen a la estabilización de una emulsión, ya que se desorben de la interfase.

III.3. PROTEINAS MUSCULARES.

Las proteínas del músculo animal se pueden clasificar en 3 grupos en base a su solubilidad en soluciones acuosas (Jones, 1988).

Proteínas sarcoplásmicas.

Son aquellas solubles en soluciones salinas cuya fuerza iónica es de 0.05 o menos.

Comprenden el 30 % del nitrógeno total del músculo de pollo.

Proteínas del estroma.

Son aquellas insolubles en soluciones acuosas neutras. Contienen al tejido conectivo del músculo y comprenden del 3 al 12 % de la proteína de la carne de pollo.

Proteínas miofibrilares.

Estas pueden ser extraídas a fuerzas iónicas mayores de 0.225. Comprenden del 45 al 48% del contenido de nitrógeno total de la pechuga de pollo. Las principales proteínas que forman parte de las miofibrilares son la miosina, la actina, la tropomiosina, las troponinas, la alfa-actina, la C-proteína y la M-proteína.

Las proteínas miofibrilares son las más importantes desde el punto de vista nutricional por su alto contenido de aminoácidos indispensables. En lo que a propiedades funcionales se refiere se estima que la contribución a la capacidad de retención de agua del músculo se debe a en un 97 % a las proteínas miofibrilares y también son responsables de la capacidad de emulsificación de la carne.

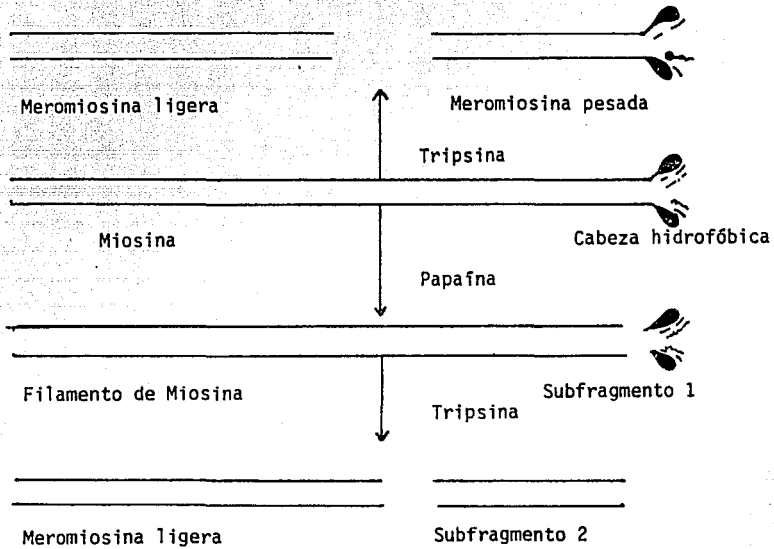
La miosina, principal proteína de el grupo de proteínas miofibrilares, se compone de 2 cadenas polipeptídicas de peso molecular de 200,000 y de cadenas más ligeras (PM de 16,000 a 25,000). Las cadenas más pesadas forman una superhélice. Existe una región en la cola de estas cadenas que no presenta estructura de alfa-hélice, que es susceptible a la

acción de proteasas y divide a la molécula de miosina en 2 segmentos: meromiosina ligera y meromiosina pesada; ésta última tiene grandes cantidades de cisteína, fenilalanina, tirosina y triptofano (Fig.2).

La molécula de miosina contiene más de 40 grupos sulfhidrilo y casi no presenta puentes disulfuro. Se considera hidrofílica ya que su contenido de aminoácidos hidrofóbicos es bajo (Morrissey, 1982).

Se han hecho pruebas de capacidad de emulsificación y estabilidad de emulsiones con miosina y actina aisladas de pechuga de pollo donde se demuestra que la miosina juega un papel importante en la formación y estabilización de emulsiones (Galluzzo, 1978; Galluzzo, 1978 a; Galluzzo, 1978 b).

FIG.2. DIAGRAMA ESQUEMATICO DE MIOSINA.



III.4. HIDROLISIS ENZIMATICA.

Las diversas propiedades funcionales que presentan las proteínas como son: capacidad emulsificante, capacidad de formación de geles y espumas y capacidad de retención de agua, entre otras, pueden ser favorecidas mediante una hidrólisis enzimática controlada, ya que modifica el tamaño molecular de las proteínas, ya que se altera su conformación y se producen cambios en las fuerzas intra e intermoleculares de los enlaces peptídicos. La ruptura o hidrólisis de los enlaces peptídicos trae como consecuencia las siguientes modificaciones:

- Incremento del número de grupos polares por lo que disminuye la hidrofobicidad del producto.
- Disminución del peso molecular de las cadenas peptídicas.
- Posible alteración en la conformación molecular, esto es, que al haber ruptura de enlaces peptídicos, se presente una separación de las subunidades de la proteína o bien se abra la compacta estructura globular, exponiendo una mayor cantidad de grupos hidrofóbicos al medio acuoso (Phillips, 1981).

En el caso de las proteínas miofibrilares, estas deben estar solubilizadas para que presenten propiedades funcionales y esto se logra por adición de sales o mediante una

proteólisis. Un estudio realizado con proteínas miofibrilares aisladas de carne de pollo demostró que con una hidrólisis enzimática parcial con proteasa ácida se solubilizaba un 46% de las proteínas miofibrilares, lo que permitió un aumento de la capacidad emulsificante con respecto al control. Esto puede deberse a que al disminuir el tamaño molecular y ser más soluble, la proteína pueda migrar con mayor facilidad a la interfase. Por otro lado cabe la posibilidad de que los fragmentos formados se desdoblén más fácilmente que la proteína intacta debido a la disminución de las fuerzas intermoleculares aumentando de esta forma la capacidad emulsificante (Smith, 1985).

Para lograr una adecuada modificación de las proteínas se deben tomar en cuenta diversos parámetros como de su hidrólisis. En primer lugar, se debe seleccionar la proteasa o proteasas a utilizar. Esta selección, depende de factores como el costo, la actividad, la estabilidad, la eficacia, la especificidad y las condiciones de temperatura y pH en las cuales las enzimas presentan mejor actividad. Las proteasas se clasifican de acuerdo a su origen (animal, vegetal o microbiano), por su acción catalítica (endopeptidasas y exopeptidasas) y por la naturaleza de su sitio activo, el cual le da características de especificidad (Burgeois, 1986). Cada enzima se caracteriza por presentar su actividad óptima a ciertas condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica. Es importante tomar en cuenta también la relación enzima-sustrato en la velocidad inicial de la hidrólisis más que la concentración misma de la enzima, porque el proceso de hidrólisis proteínica es ideal que se lleve a cabo en condiciones de saturación de la enzima. También es importante tomar en cuenta la naturaleza del sustrato. Si la proteína está desnaturalizada los enlaces peptídicos se

encuentran más accesibles por lo que la cinética de la hidrólisis es diferente a la proteína en su estado original. Cuando la proteína sufre una desnaturalización irreversible, ésta tiende a agregarse y se vuelve insoluble alterando la velocidad de hidrólisis por fenómenos de adsorción y difusión. Saha demostró que la proteína de pescado es digerida más fácilmente con pepsina y tripsina cuando es ligeramente cocido, comparado con pescado crudo. Por otro lado, se ha observado que la cocción de proteína de soya mejora la digestibilidad in vitro. Sin embargo si el tratamiento con autoclave es más severo, disminuye su digestibilidad a causa de que el calor induce reacciones como la de Maillard y formación de nuevos enlaces que no hidrolizan las proteasas del sistema digestivo.

Una proteólisis, además de mejorar las propiedades funcionales de las proteínas, puede mejorar su digestibilidad y también reducir las alergias que frecuentemente causan. Sin embargo, la hidrólisis enzimática puede presentar desventajas, ya que pueden formarse péptidos amargos. El bien conocido sabor amargo de muchos hidrolizados proteínicos provocó que las primeras investigaciones se realizaran en torno a este problema. Ahora se sabe que el sabor amargo se relaciona con el grado de hidrólisis y con el carácter hidrofóbico de los péptidos formados. A mayor grado de hidrólisis, se incrementa la formación de péptidos amargos solubles hasta llegar a la hidrólisis total en donde desaparece el sabor amargo. Actualmente, es posible eliminar el sabor amargo de los hidrolizados proteínicos mediante una separación selectiva, por reacción de plasteína, por enmascaramiento o por aplicación de exopeptidasas.

Se ha discutido la posibilidad de que la hidrólisis de las proteínas de lugar a la formación de péptidos fisiológicamente activos durante la proteólisis, semejantes a las encefalinas y otras hormonas, que alteran el metabolismo, sin embargo, no ha sido comprobado (Adler, 1986).

PARTE EXPERIMENTAL.

IV. MATERIALES Y METODOS.

IV.1. SUSTRATO.

La fuente de proteína empleada para este proyecto consistió en carne de pechuga de pollo sin piel, deshuesada y cocida 15 min a 15 lb/in² de presión. La pechuga cocida se mezcló con agua en un homogenizador Ultraturrax (mod. 725) a 24000 rpm durante un minuto. El porcentaje de proteína se determinó por el método de microKjeldahl, utilizando un sistema de digestión y su unidad destiladora Kjeltac 1007 y 1002 respectivamente (Tecator, Prabin & Co. AB, Klippan).

Una vez determinada la proteína, las muestras se almacenaron congeladas en lotes de 500 g.

IV.2. ENZIMAS PROTEOLITICAS.

Las proteasas propuestas inicialmente, con base a su disponibilidad y costos fueron las siguientes:

- 1) Neutrasa 0.5L (NOVO, Bioteca S.A. de C.V.).**
- 2) HT-Proteolytic 200. (Enmex S.A. de C.V.).**
- 3) Proteasa 2A (AMANO.Enzimas y Productos Químicos S.A.)**
- 4) Papaína (Enmex S.A. de C.V.).**
- 5) Proteasa M (AMANO. Enzimas y Productos Químicos S.A.)**
- 6) Alcalasa (NOVO, Bioteca S.A. de C.V.).**

Estas enzimas fueron seleccionadas con base a propiedades funcionales que presentaban emulsiones elaboradas con sus hidrolizados, como se explica en la parte de preparación de emulsiones y evaluación de su estabilidad, así como a los valores de pH y temperaturas en las cuales las enzimas presentan la mejor actividad. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Temperaturas y pH de las enzimas proteolíticas. *

ENZIMA	ORIGEN	ACTIVIDAD (UA)	pH	T(°C)
Amano 2A	<i>Aspergillus oryzae</i>	20,000 ^a	6-10	50
Proteasa M	<i>Aspergillus oryzae</i>	5,500 ^a	3-6	50
HT proteolytic 200	<i>Bacillus subtilis</i>	200 ^b	6.5-8	45-55
Papaina	<i>Carica papaya</i>	100-1,300 ^c	5-6	65-70
Neutrase	<i>Bacillus subtilis</i>	0.5 ^d	5.5-7.5	45-55
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.6 ^d	6.5-10	50-60

a. Unidad de Actividad = gramos de enzima necesarios para liberar 100 microgramos de L-tirosina sobre caseína en 60 min. a pH 7 y 37 °C.

b. Unidad Northrop = g de enzima necesarios para hidrolizar 40 % de caseína en 60 minutos, pH 7.4 y 40 °C.

c. Las unidades de papaína varían de acuerdo a la aplicación que se le de a la enzima.

d. Unidad Anson = g de enzima necesarios para producir un miliequivalente de tirosina sobre hemoglobina desnaturalizada por min. a pH 7.5.

* Tomado de:

- Protease Amano 2A. Technical Bulletin. Amano International Enzyme Co.
- HT-Proteolytic. Technical Information. Miles Laboratories Inc. 1977.
- Enzymatic modification of proteins using Novo Proteases. Novo- Nordisk.

IV.3. HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA PECHUGA DE POLLO.

Para la hidrólisis enzimática se seleccionó una concentración en base húmeda de proteína del 6 % preparada con una alícuota del homogenizado de pollo y diluyendo con agua destilada a 50 °C. Esta concentración permite un manejo adecuado de la materia prima y posteriormente una fácil formulación.

Las condiciones de hidrólisis fueron ensayadas en los siguientes intervalos:

Para la relación enzima/sustrato (g enzima/ 100g proteína) se seleccionaron las siguientes concentraciones: 0.10, 0.25, 0.50, 1.0.

La enzima se incorporó al sustrato disuelta en agua destilada. Estas concentraciones se eligieron en base a datos reportados en la literatura (Smith, 1985) y a ensayos preliminares llevados a cabo en el laboratorio.

Los tiempos de hidrólisis ensayados fueron: 40, 80, 120 y 240 minutos.

El pH y la temperatura de cada ensayo se fijó en los valores óptimos para cada enzima (Cuadro 10).

Las hidrólisis se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml y se colocaron en una cámara de agitación y temperatura controladas (New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison NJ, U.S.A., Mod.R-25). Se fijó la velocidad de agitación a 100 rpm que permitió mantener homogénea la mezcla de reacción.

Una vez terminada la hidrólisis, las enzimas se inactivaron en un baño a ebullición durante 10 minutos (Lara, 1990).

El porcentaje de proteína solubilizada en cada hidrolizado se determinó utilizando el método de Lowry (1951) en una muestra del sobrenadante, después de precipitar la proteína no solubilizada con sulfato de zinc e hidróxido de sodio (Somogyi M., 1930). Este método de precipitación consiste en añadir cantidades iguales de una solución 0.1 N de sulfato de zinc y 0.5 N de hidróxido de sodio. Esto permite obtener un sobrenadante claro que contiene la proteína soluble y que es neutro, lo que evita interferencias con el método de Lowry. Para cada hidrolizado se hizo el experimento por triplicado. El porcentaje de proteína soluble se calculó como los gramos de proteína soluble por 100 g de proteína original del sustrato, al cual se le denominó " grado de hidrólisis" para efecto del presente trabajo.

$$\% \text{ Proteína soluble} = \frac{\text{g de proteína solubilizada} \times 100}{\text{g de proteína original}}$$

IV.4. PREPARACION DE LAS EMULSIONES Y EVALUACION DE SU ESTABILIDAD.

Con base a los resultados clínicos obtenidos a partir del uso de las fórmulas transicionales de pollo, el equipo de los Doctores García Aranda y Nurko del Hospital Infantil decidió emplear la fórmula V (Cuadro 11) por ser la de mayor densidad calórica. El aumento en el valor energético de la fórmula, permite una ganancia significativa en el peso siendo más rápida la recuperación del paciente.

Cuadro 11. Fórmula V de pollo.

Proteína (g/dl)	2.6
Carbohidratos (g/dl)	10.7
Lípidos (g/dl)	3.5
Energía (Kcal/dl)	84.8

Es en base a ésta fórmula se propusieron las siguientes modificaciones. En primer lugar se realizó una hidrólisis enzimática de la proteína de pechuga de pollo con el fin de mejorar sus propiedades funcionales. También se sustituyó una parte de la sacarosa por sólidos de jarabe de maíz con el propósito de reducir la osmolaridad de la fórmula. Además se utilizó lecitina de soya (LECSAM, Grado Alimentario. SANBRA, S.A.) como un emulsificante que es aceptado como un ingrediente apto para ser aplicado en fórmulas infantiles de acuerdo al Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 1981). La concentración

máxima permitida es de 0.5g/100 ml. En éste trabajo se emplearon las siguientes concentraciones: 0.33, 0.30, 0.20 y 0.10 % a fin de seleccionar la más apropiada.

Cada hidrolizado de pollo se mezcló con el resto de los componentes de la fórmula en una licuadora durante un minuto a la velocidad máxima para formar emulsiones. Para medir la estabilidad de las emulsiones se ensayaron diversos métodos, todos ellos basados en el principio de coalescencia. Un método simple, consistió en medir el índice de coalescencia a través de la turbidez que presentan las emulsiones al provocarles un daño mecánico (Britten, 1991). Para determinar el índice de coalescencia, se tomaron muestras de 100 ml de cada una de las emulsiones en matraces Erlenmeyer de 250 ml y se colocaron en una incubadora a temperatura ambiente, agitando a 150, 250 y 350 rpm durante 6 horas. Se tomaron alícuotas de 0.10 ml cada hora y se diluyeron 5000 veces en buffer de fosfato de sodio, agregando 0.5 % de dodecilsulfato de sodio (SDS). Se midió la densidad óptica a 500 nm en un espectrofotómetro. El índice de coalescencia de las emulsiones está relacionado con la disminución de la turbidez.

Otro método consistió en centrifugar a las emulsiones a altas velocidades, a fin de medir la franja de emulsión que quedaba después de la agitación. Se tomaron alícuotas de 10 ml de cada una de las emulsiones y se colocaron en una centrifuga a 500, 1000, 3000 y 5000 rpm. Este método también se hizo en presencia de un colorante soluble en grasa (Sudan IV), para que la medición fuera más sencilla.

Por último, se empleó un método que permite cuantificar fácilmente el volumen de cremado y observar la separación de fases. Las emulsiones se vertieron en probetas de 100 ml de capacidad y se dejaron en reposo a temperatura de 5 °C. Después de 24 horas de reposo, la estabilidad de las emulsiones fue evaluada visualmente en términos de su cremado y separación de fases. Las calificaciones fueron asignadas de acuerdo a una escala hedónica de 1 a 4 para evaluar dos características principales de una emulsión no estable:

1. El volumen de cremado, que corresponde a una fracción grasa más concentrada y aún en forma de emulsión, que asciende a la superficie de la emulsión restante.
2. La separación de fases caracterizada por la formación de un precipitado y/o la presencia de grumos en suspensión que eventualmente se separan dejando una fracción líquida menos concentrada. Los valores asignados al cremado y separación de fases se ponderaron de acuerdo a su importancia en el proceso de desestabilización, asignándole un 30% al volumen de cremado y un 70 % a la separación de fases, considerando que el fenómeno de separación de fases tiene una mayor repercusión sobre la estabilidad de la emulsión.

Se realizaron dos controles con proteína intacta: uno sin lecitina y otro con lecitina.

El análisis estadístico de las calificaciones de cada emulsión se realizó mediante un diseño factorial usando un paquete estadístico SPSSX (Paquete estadístico para ciencias sociales - X) y SPSS-PC (Paquete estadístico para ciencias sociales - PC). El experimento

se realizó por duplicado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rango múltiple (Duncan) empleando 95% y 99 % de niveles de significancia.

Con base a los resultados del análisis estadístico se analizó la influencia de las condiciones de proteólisis sobre la estabilidad de las emulsiones. De esta manera se eligieron las condiciones óptimas de la hidrólisis para estabilizar la formulación.

La osmolaridad de las emulsiones se determinó en un osmómetro (Precision Systems Inc. Mod. Osmette 2007. Natick Mass, USA). El principio de la medición se basa en la disminución de la temperatura del punto de congelación de una solución, dependiendo de la concentración de solutos en la misma. El osmómetro se calibró utilizando estándares de 100 y 500 mOsm/Kg. Se tomaron alícuotas de 200 microlitros y se realizó la medición por duplicado. Así mismo se midió la osmolaridad de los hidrolizados obtenidos en condiciones extremas (0.10 % E/S, 40 minutos y 1.0% E/S, 120 minutos) para ver los niveles de osmolaridad que aporta a la emulsión final la proteína solubilizada. Para poder medir la osmolaridad, fué necesario homogeneizar los hidrolizados con aceite (3.6 %) y lecitina (0.33%).

También se midió el tamaño de los glóbulos grasos utilizando un microscopio con ocular calibrado, diluyendo la emulsión 1:50 con agua.

Una vez definidas las condiciones óptimas de hidrólisis que permitan la formación de una emulsión estable, se procedió a elaborar un lote de mayor volumen para secar por aspersión con el objeto de prolongar la vida de anaquel del producto. Para este propósito la hidrólisis se llevó a cabo por lotes en un jarra de 4 litros con agitación y temperatura controladas.

La emulsión se realizó en un molino coloidal Puc Vikosator (Alemania). El secado por aspersión se realizó en un equipo Niro Atomizer (Soeborg, Denmark). Ambos equipos se localizan en la planta piloto de productos lácteos de la ENCB del IPN.

El producto en polvo se sometió a un análisis proximal de humedad, proteína, grasas, carbohidratos y cenizas (A.O.A.C., 1985) así como los análisis microbiológicos correspondientes para determinar cuenta en placa (NOM F-198,1971), coliformes (NOM F-199, 1970) hongos y levaduras (NOM F-255, 1978) y Salmonella (NOM. F-304, 1977). Cabe señalar, que estos análisis microbiológicos se hicieron en cada etapa del proceso, es decir, al pollo crudo, cocido, al hidrolizado, a la fórmula homogenizada y finalmente al producto en polvo.

El producto en polvo se rehidrató y se colocó en una probeta de 100 ml que se refrigeró durante 24 horas para observar su estabilidad, de la misma forma que las emulsiones anteriores.

V. RESULTADOS Y DISCUSION.

V.1. CARACTERIZACION DEL SUSTRATO.

Se empleo como sustrato pechuga de pollo deshuesada y sin piel, cocida durante 15 minutos a 15 lb/ in². La cocción tuvo la finalidad de eliminar Salmonella Spp., que es un microorganismo patógeno que se encuentra en la carne de pollo cruda; por otro lado, la digestibilidad de las proteínas aumenta cuando éstas se encuentran desnaturalizadas (Badui, 1989).

Una vez elegida como materia prima la pechuga de pollo cocida, se determinó un análisis proximal. Los resultados se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Análisis proximal de pechuga de pollo cocida 15 minutos a una presión de 15 lb/in².

	Proteína	Lípidos	Cenizas	Carbohi- dratos	Fibra
Base húmeda	90.87 %	2.42 %	2.50 %	0.0 %	0.0 %
Base seca	94.86 %	2.53 %	2.61 %	0.0 %	0.0 %

Estos valores son similares a los obtenidos por Appendini (1992); las variaciones que existen pueden deberse a diversos factores como la alimentación del animal, el acondicionamiento de la muestra, etc. El contenido de grasa es menor en el presente trabajo, esto se debe a que todo residuo grasoso en el pollo fue eliminado antes de cocerlo.

V.2. OPTIMIZACION DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA.

V.2.1. SELECCION DE ENZIMAS..

Los resultados de la proteólisis fueron evaluados en este trabajo en base a la capacidad del hidrolizado para formar emulsiones estables.

De las enzimas propuestas inicialmente se descartaron la Proteasa M, Papaína y Alcalasa, aún en los casos de hidrólisis más ligera (% E/S = 0.10, tiempo = 40 min.) o más exhaustiva (% E/S = 1.0, tiempo = 240 min.) ya que nunca se lograron con sus hidrolizados, emulsiones estables. Esto se puede deber a que el pH óptimo de actividad para las enzimas Proteasa M y Papaína (5.0) es cercano al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares que es de 5.4 , lo que ocasiona que la proteína se agregue y sedimente (Price J.F., 1976).

Por lo que se refiere a la Alcalasa, su pH óptimo de actividad es de 9.0, valor que se encuentra 3 unidades arriba del pH natural del sustrato (6.2). Trabajar con proteínas a valores de pH tan elevados no es conveniente puesto que podría ocasionar una disminución del valor nutricional por la destrucción de aminoácidos indispensables, racemización y el desarrollo de uniones entre algunos aminoácidos para formar lisinoalanina o la ornitinalanina (Satterlee L.D., 1984).

Las mejores emulsiones se obtuvieron con la Neutrasa, HT Proteolytic 200 y Amano 2A. Esto facilita el proceso ya que no existe la necesidad de modificar el pH natural del sustrato (6.2) puesto que en este valor ninguna enzima trabaja por debajo de 90 % de su actividad según las especificaciones de los fabricantes.

La temperatura óptima de actividad de estas tres proteasas es de 50°C lo que disminuye el riesgo de una posible contaminación microbiana durante el proceso de hidrólisis.

Las tres enzimas se encuentran disponibles en el mercado mexicano, aunque sólo HT Proteolytic 200 se produce en el país (Cuadro 13).

Cuadro 13. Costos por Kg y Unidad de Actividad de enzimas HT Proteolytic 200, Amano 2A y Neutrase.*

ENZIMA	Costo(N\$)/UA**	Costo(N\$)/Kg
HT Proteolytic 200	5.68×10^{-6}	60.00
Amano 2A	4.27×10^{-6}	575.72
Neutrasa	1.79×10^{-5}	33.75

* Mayo, 1992.

** Actividad medida sobre caseína al 2 %. pH 7 y 50 °C.

V.2.2. SOLUBILIZACION DE LA PROTEINA.

Los resultados de la evaluación de la proteína soluble de cada uno de los hidrolizados, estimados a partir del método de Lowry se presentan en los cuadros 14a, 14b, 14c para Neutrasa, HT Proteolytic 200 y 2A respectivamente. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

Cuadro 14a. Porcentaje de proteína solubilizada con Neutrasa a diferentes tiempos de hidrólisis.

% E/S (gE/100gS)	0.10	0.25	0.50	1.00
Tiempo (min)				
40	1.093	1.846	2.911	3.751
80	1.558	2.723	3.704	4.237
120	2.096	3.055	4.220	4.872
240	2.531	3.352	4.714	5.558

Cuadro 14b. Porcentaje de proteína solubilizada con Proteasa HT Proteolytic 200 a diferentes tiempos de hidrólisis.

% E/S (gE/100gS)	0.10	0.25	0.50	1.00
Tiempo (min)				
40	1.064	1.964	2.867	4.886
80	1.492	2.672	3.883	5.447
120	1.853	3.013	4.768	6.170
240	2.266	4.940	6.755	9.166

Cuadro 14c. Porcentaje de proteína solubilizada con Proteasa 2A a diferentes tiempos de hidrólisis.

% E/S (gE/100gS)	0.10	0.25	0.50	1.00
Tiempo (min)				
40	2.919	3.026	4.754	5.715
80	2.686	4.001	5.580	7.778
120	3.070	5.137	6.819	8.269
240	3.928	4.813	9.277	10.874

Como era de esperarse, al aumentar la concentración de enzima y el tiempo de hidrólisis, aumenta el porcentaje de proteína soluble.

A bajas concentraciones de enzima, la cantidad de proteína solubilizada por las enzimas Neutrasa y HT-Proteolytic-200 es similar. La enzima Amano 2A denota su mayor actividad en la mayoría de las condiciones ensayadas. La Neutrasa presenta el menor grado de hidrólisis en en todas las condiciones ensayadas, a excepción de la HT Proteolytic 200, que a 0.10 % E/S se alcanzan los menores grados de hidrólisis.

Se puede observar que a 240 minutos el grado de hidrólisis no sobrepasa el 11 % de proteína solubilizada en ninguno de los casos (Fig. 3, 4 y 5).

FIG. 3

PROTEASA HT

PORCIENTO DE PROTEINA SOLUBLE VS TIEMPO

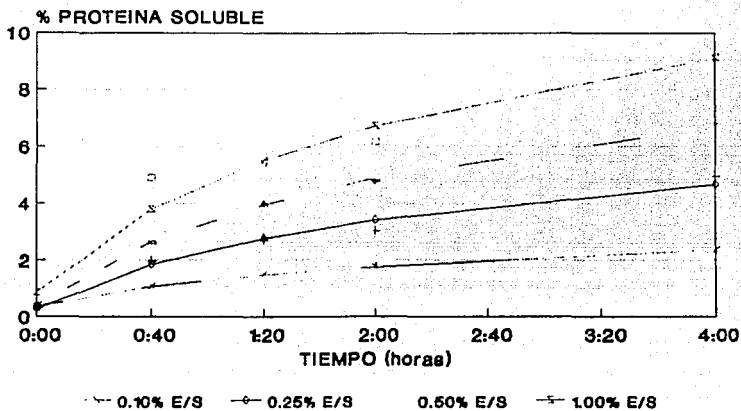


FIG. 4

PROTEASA 2A

PORCIENTO DE PROTEINA SOLUBLE VS. TIEMPO

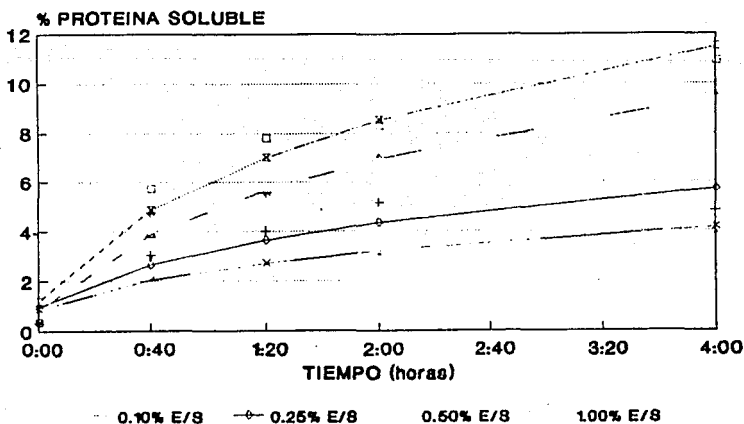
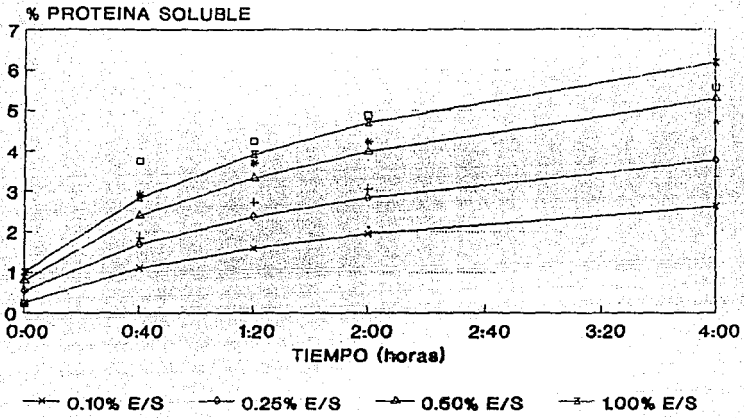


FIG. 5

NEUTRASA

PORCIENTO DE PROTEINA SOLUBLE VS. TIEMPO



V.3. DESARROLLO DE LA FORMULA.

La selección de las condiciones de hidrólisis se hizo en función de la estabilidad de las emulsiones hechas con cada uno de los hidrolizados a los diferentes tiempos, concentraciones y tipos de enzimas. Para elaborar las emulsiones se realizaron algunas modificaciones, que se describen a continuación.

Se propuso sustituir a la sacarosa por maltodextrinas (sólidos de jarabe de maíz) en un 30 % a fin de disminuir la osmolaridad, ya que la fórmula que contiene sacarosa como única fuente de carbohidratos presenta niveles de 420 mOsm/l. Esto aumenta las posibilidades de diarrea osmótica en algunos pacientes. En el mercado nacional Arancia S.A. de C.V. comercializa una amplia gama de maltodextrinas que varían en D.E.(dextrosa equivalente) entre 20 y 60. En este trabajo se seleccionaron 3 de las maltodextrinas de menor D.E. para evitar en lo posible los problemas de higroscopicidad que caracterizan a las maltodextrinas de bajo peso molecular, así como para no contribuir en forma importante a la osmolaridad del producto final.

En el cuadro 15 se presentan los valores de osmolaridad determinados experimentalmente para soluciones que contienen las distintas fuentes de carbohidratos propuestas en el porcentaje marcado por las fórmulas, que es de un 10.0 %. Es importante notar que la sacarosa presenta una osmolaridad muy superior a la de las maltodextrinas. El cuadro 16 muestra valores de osmolaridad de algunas fórmulas comerciales.

Cuadro 15. Determinación de osmolaridad.

Carbohidratos (10.0 %)	Osmolaridad (mOsm/l)
Sacarosa	324
Amidex 36	246
Amidex 30	184
Amidex 20	137

Cuadro 16. Niveles de osmolaridad de fórmulas comerciales.*

Fórmula	Osmolaridad(mOsm/l)
Vivonex (Norwich Pharmacal)	810
Nutramigen (Mead-Johnson)	443
Pregestimil (Mead-johnson)	590
Vital (Ross)	450

* Koretz and Meyer. Gastroenterology, Vol. 78. N0.2 p.395

Otra de las ventajas de utilizar polímeros de glucosa es que aumentan la viscosidad de las fase continúa en las emulsiones favoreciendo la suspensión de los sólidos y reduciendo la velocidad de cremado, por lo que se obtienen emulsiones más estables.

La sacarosa pudo ser sustituida por las maltodextrinas ya que son fácilmente digeridas por las enzimas pancreáticas obteniéndose maltosa e isomaltosa, las cuales son hidrolizadas por disacaridasas o glucoamilasas, absorbiéndose en el intestino delgado. Los pacientes en las condiciones de desnutrición normalmente tratados en el Departamento de Nutrición y Gastroenterología del Hospital Infantil, poseen una función pancreática suficiente para lograr la digestión de este tipo de carbohidratos.

La formulación modificada presenta un contenido de grasa de 4 % , que es un valor mayor al de la leche y de algunas fórmulas infantiles del mercado. Los resultados preliminares obtenidos en el hospital indican una mayor tolerancia a los lípidos corroborando lo reportado por Jirapinyo y col. (1990).

La fórmula modificada final se presenta en el cuadro 17.

Cuadro 17. Fórmula modificada de la dieta a base de pechuga de pollo.

Proteína de pollo hidrolizado	2.60 g/100 ml
Lípidos	
Pollo	0.07 g/100 ml
Aceite de maíz	3.60 g/100 ml
Lecitina	0.33 g/100 ml
Carbohidratos	
Sacarosa	7.00 g/100 ml
Amidex 20	3.00 g/100 ml

V.5. EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES.

De los métodos utilizados para medir la estabilidad de las emulsiones, se descartó el de Britten (1991), ya que no se observó ninguna diferencia entre las densidades ópticas de ninguna de las emulsiones.

El método de centrifugar a las emulsiones a altas velocidades, a fin de medir la franja de emulsión que quedaba después de la agitación también se descartó, ya que no se obtuvieron resultados positivos; aún a 5000 rpm, la emulsión no se desestabilizó.

Debido a que no se obtuvieron resultados definitivos con los dos métodos descritos anteriormente, se optó por emplear la evaluación visual (descrita en la sección de materiales y métodos), en la cual se consideraron dos fenómenos de desestabilización: cremado y separación de fases. En esta sección se describe el resultado de la ponderación asignada a cada uno de los fenómenos de acuerdo a su importancia en el proceso de desestabilización de estas emulsiones en particular (Cuadro 19).

Para el volumen de cremado se consideró que un volumen mayor de 10 ml(un 10 % del volumen total de la emulsión) debería tener la calificación más baja:1.0 y si no existía cremado alguno, la calificación debería ser la máxima:4.0. En experimentos preliminares se había determinado que el volumen de cremado máximo era aproximadamente de 10 ml.

Para la separación de fases que en el caso particular de esta emulsión produce un sedimento incapaz de sostenerse en la emulsión o bien una total separación de las fases se consideró el volumen del sedimento hasta 20 ml (20 % del volumen total de la emulsión) con calificaciones entre 2.5 y 1.5. Para el caso de una separación de fases (separación de fases total) la calificación asignada es 1.0 (ver cuadro 18). El cremado en una emulsión es "reversible" puesto que los glóbulos grasos no han perdido su integridad, solamente se han agregado. La emulsión toma su apariencia normal con una agitación leve. Por el contrario, la separación de fases indica una completa desestabilización irreversible. Es por esto que las calificaciones de uno y otro fenómeno fueron ponderadas en un 30 y un 70 % para el caso de volumen de cremado y separación de fases respectivamente.

Cuadro 18. Evaluación de estabilidad de emulsiones.

	<u>X (ml)</u>	<u>Calificación</u>
Volumen de Cremado.	X = 0	4.0
	X < 5	3.0
	5 < X < 10	2.0
	X > 10	1.0
Separación de fases.		
- Sin separación		4.0
- Separación ligera		
(Volumen de sedimento)	X < 10	2.5
	10 < X < 20	2.0
	X > 20	1.5
Separación total		1.0

* El volumen de cremado corresponde al 30 % de calificación y la separación de fases un 70 %.

Se obtuvieron dos calificaciones para cada una de las emulsiones, las cuales se promediaron y cuyo resultado se presenta en el cuadro 19.

Cuadro 19. Calificación de las emulsiones elaboradas con los hidrolizados a diferentes condiciones de hidrólisis.

Tiempo(min)	% E/S	PROTEASA HT				NEUTRASA				PROTEASA 2A			
		0.10	0.25	0.50	1.00	0.10	0.25	0.50	1.00	0.10	0.25	0.50	1.00
40		1.80	1.95	2.12	2.30	4.00	4.00	3.30	3.30	1.82	1.65	1.65	1.47
80		1.82	1.95	2.15	2.12	4.00	2.70	2.85	3.30	1.65	1.65	1.95	1.80
120		1.80	1.97	1.97	2.15	3.30	3.00	3.30	3.30	1.80	1.60	1.77	2.05
240		2.30	2.30	2.15	1.95	3.15	3.00	3.00	3.30	1.95	1.92	1.60	1.00

(% E/S = g de Enzima/100 g de preteína del sustrato).

El análisis estadístico muestra que existen diferencias altamente significativas entre las tres enzimas empleadas (ANEXO 1), siendo la Neutrasa la que presentó los mejores resultados, seguida por la HT-Proteolytic-200 y finalmente la proteasa Amano 2A. Con base a los resultados anteriores se realizó un estudio estadístico de las calificaciones obtenidas con Neutrasa (ANEXO 2). Este análisis mostró diferencias significativas entre los tiempos de hidrólisis y las concentraciones de enzima.

En cuanto al tiempo, la prueba de rango múltiple (DUNCAN) indica que existe diferencia entre los 40 minutos y el resto de los tiempos. Entre los 80, 120 y 240 minutos no existe diferencia, por lo que el mejor tiempo a seleccionar es de 40 minutos.

En lo referente a las concentraciones de enzima, las emulsiones con las mejores calificaciones fueron las de los hidrolizados a concentraciones de 0.1 % y 0.25 % en tiempos cortos de reacción. La tendencia en los resultados de Neutrasa muestra que las mejores emulsiones se obtienen con bajas concentraciones de enzima y los tiempos más cortos de hidrólisis, indicando que con una hidrólisis limitada se logra estabilizar la emulsión. Esto a su vez, tiene la ventaja de una baja aportación de los hidrolizados a la osmolaridad (Cuadro 20).

Si se examinan los datos correspondientes al porcentaje de proteína solubilizada con la Neutrasa (cuadro 14a), a valores de proteína solubilizada mínimos de 1.093 %, 1.558 y 1.846 % como un máximo, se obtienen las mejores calificaciones en términos de estabilidad de la emulsión. Valores de solubilización mayores a 1.846 no son capaces de formar emulsiones estables (obtienen calificaciones menores o iguales a 3.30), para ninguna enzima.

El análisis estadístico muestra que existe un efecto lineal del tiempo sobre la estabilidad de las emulsiones; a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, la estabilidad disminuye. La concentración de enzima tiene un efecto cuadrático sobre la estabilidad de las emulsiones; esta tendencia se aprecia mejor en la curva de calificaciones contra

concentración de enzima (ANEXO 2). La disminución de la calificación a 0.25 % y 0.5 % E/S puede deberse a la formación de agregados, los cuales se rompen al aumentar la concentración de enzima a 1.0 % y se forman péptidos que al igual que a bajas concentraciones permiten estabilizar la emulsión.

Los tiempos y las concentraciones de enzima presentan una interacción altamente significativa, lo que indica que ambas variables influyen de manera conjunta sobre la estabilidad de las emulsiones y cuyos efectos no deben verse aislados.

Cuadro 20. Osmolaridad (mOsm/l) de los hidrolizados proteínicos de pollo.*

ENZIMA	OSMOLARIDAD (mOsm/l)
Neutrasa	43.6 ^a
	52.4 ^b
HT-Proteolytic 200	47.3 ^a
	60.4 ^b
Proteasa 2A	52.4 ^a
	152.2 ^b

a = 0.10 % E/S. Tiempo 40 minutos.

b = 1.0 % E/S. Tiempo 120 minutos.

* Hidrolizados emulsificados con aceite y lecitina en las proporciones indicadas en materiales y métodos, en una mezcla libre de carbohidratos.

Sin embargo el porcentaje de solubilización no debe considerarse aisladamente. Pueden obtenerse niveles similares de solubilización con HT-Proteolytic-200 pero estos hidrolizados no son capaces de formar emulsiones estables. Esto puede ser explicado por la especificidad de cada una de las enzimas. Si la proteasa formara péptidos de bajo peso molecular, estos no tendrían la capacidad de desdoblarse y recubrir los glóbulos de grasa correctamente, lo que probablemente sucede con HT-Proteolytic-200 y Proteasa 2A.

Por lo tanto las condiciones de hidrólisis escogidas en base a las calificaciones de las emulsiones fueron:

- **Enzima: Neutrasa**
- **Tiempo de hidrólisis: 40 min.**
- **Concentración E/S: 0.10 %**

Se probaron concentraciones aún menores (0.050% y 0.025 % E/S) de Neutrasa a los tiempos de 40 y 240 min., para reducir los costos. Sin embargo, las emulsiones formadas se separaban por completo a los pocos minutos de su elaboración.

Al alcanzar altos grados de hidrólisis sí se eleva el porcentaje de proteína solubilizada, pero los péptidos serán de menor peso molecular incapaces de formar una capa que alcance a cubrir toda la superficie de los glóbulos de grasa, resultando así, emulsiones menos estables.

Aunque el porcentaje de proteína soluble es semejante para la Neutrasa y la proteasa HT-Proteolytic-200 durante las primeras dos horas de hidrólisis, no se obtiene la misma calidad de emulsiones. Esto implica que la estabilidad está basada en el tipo de enlaces que se rompen y por lo tanto en el tipo de péptido formado y no así del grado de hidrólisis. La composición de los péptidos formados influye sobre su capacidad emulsificante y estabilidad.

Una de las mayores desventajas de los hidrolizados proteínicos es su desagradable sabor amargo. Este sabor es impartido por los péptidos que tienen en el grupo amino-terminal aminoácidos hidrofóbicos o aromáticos (Adler, 1986).

Para el caso de los hidrolizados de carne de pollo, el hecho de que el porcentaje de proteína solubilizada sea bajo, que los péptidos formados sean aparentemente de alto peso molecular y que las proteínas de pollo se consideren hidrofílicas, tiene una enorme ventaja para una fórmula infantil que se consume principalmente en forma oral ya que los hidrolizados no son amargos.

Una vez elegidas las condiciones de hidrólisis se intentó reducir el nivel de lecitina utilizada. El valor de 0.33 % se aplicó en base a resultados previos de otras formulaciones elaboradas en el Departamento de Alimentos y Biotecnología para dietas bajas en fenilalanina (Lara P., 1990). Se realizaron experimentos para emulsificar la fórmula de pollo hidrolizado con concentraciones de lecitina de 0.30 %, 0.20% y 0.10%. Con ninguna

se obtuvo una emulsion estable, por lo que se mantuvo el valor de 0.33 % , el cual está en acuerdo con lo indicado por el Codex Alimentarius (1981).

V.5. ESCALAMIENTO DEL PROCESO.

Una vez elegidas las condiciones de hidrólisis, se procedió a elaborar la fórmula a nivel planta piloto (Fig. 6).

El proceso escalado a 40 litros de emulsión sufrió algunas modificaciones con respecto a los experimentos realizados a nivel laboratorio. A continuación se describe el proceso escalado.

La pechuga de pollo sin piel y deshuesada se sometió a cocción en autoclave 15 minutos a 15 lb/in² de presión. Posteriormente se homogenizó con el agua de cocción en un "Cutter", posteriormente en un "Ultraturrax" y se le determinó la proteína por el método de microKjedahl.

Una vez determinada la proteína se ajustó con agua hasta alcanzar el 6 %. La mezcla se llevó a un tanque con agitación y temperatura controlados de 4 litros, controlando la temperatura hasta alcanzar 50 °C. Se agregó la enzima Neutrasa al 0.10 % (g de enzima/ 100 g proteína), agitando a 500 rpm durante 40 minutos. Este proceso

se hizo por lotes de 3.5 litros hasta obtener un volumen final de 17.5 litros de hidrolizado. Una vez terminado el periodo de hidrólisis, el hidrolizado se desactivó durante 3 minutos a 80 °C en horno de microondas (Samsung Mod. MW8710. Suweon, Korea) a su nivel máximo de potencia.

El hidrolizado se mezcló con la cantidad necesaria de aceite de maíz, lecitina, maltodextrinas, minerales y agua hasta obtener un volumen final de 40 litros (13 % de sólidos). La lecitina se incorporó disuelta en el aceite de maíz y las maltodextrinas disueltas en agua.

Se emplearon maltodextrinas con un D.E. = 10 y un D.E. = 20 en la proporción 1:5 respectivamente con la finalidad de promover un proceso de encapsulación, o sea que las maltodextrinas por su peso molecular y sus características no solo permiten aumentar la viscosidad de la fase continua, sino que también ayudan a recubrir la superficie de los glóbulos de grasa en la emulsión y así promover la estabilización. Esto facilita el proceso de secado. Los minerales a su vez mejoran la recolección del polvo en el secador.

La sacarosa no se incorporó a la fórmula antes del proceso de secado ya que en pruebas preliminares, al ser sometido el homogeneizado con sacarosa al secado por aspersión, se obtenía una mezcla elástica o "chiclosa" que se adhería a las paredes del secador dificultando su recolección.

El homogeneizado se sometió posteriormente a un secado por aspersión en un Niro Atomizer previamente lavado y desinfectado con hipoclorito de sodio (2500 ppm). Las condiciones del secado fueron: temperatura de entrada 190 a 200 °C y la de salida de 100 °C. Si la temperatura de salida era menor a 100 °C, el producto se humedecía fácilmente, sin embargo no se eligió una temperatura mayor a 100 °C para evitar reacciones de Maillard.

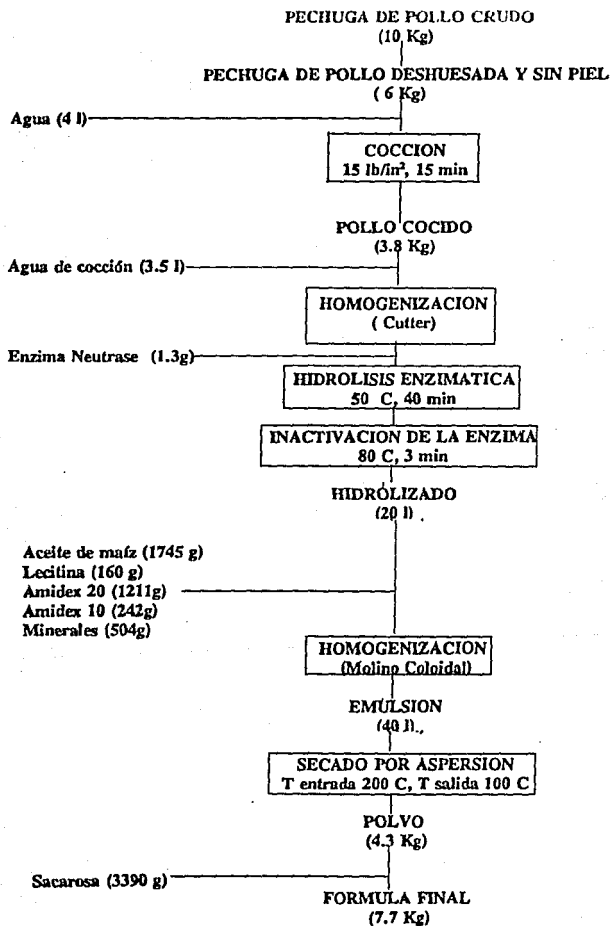
Para el proceso escalado a 40 litros se utilizó un molino coloidal con el que se obtuvieron en 2 pasadas emulsiones sumamente estables, con tamaños de glóbulos de 2 a 3 micras de diámetro.

Como resultado del secado se obtuvo un polvo ligeramente higroscópico, de color amarillo claro, el cual se mezcló con la sacarosa pulverizada para obtener un tamaño de partícula uniforme (Cuadro 21).

Cuadro 21. Fórmula modificada de la dieta a base de pechuga de pollo.

Proteína de pollo hidrolizado	2.60 g/100 ml
Lípidos	
Pollo	0.07 g/100 ml
Aceite de maíz	3.60 g/100 ml
Lecitina	0.33 g/100 ml
Carbohidratos	
Sacarosa	7.00 g/100 ml
Amidex 20	2.50 g/100 ml
Amidex 10	0.50 g/100 ml

FIG. 6. DIAGRAMA DE ELABORACION DE LA FORMULA



El análisis proximal del polvo se muestra en el cuadro 22.

Cuadro 22. Análisis proximal del polvo sin sacarosa.

	Proteína	Grasa	Carbo- hidratos	Humedad	Cenizas
Base húmeda	23.00 %	34.58 %	29.17 %	4.0 %	9.25 %
Base seca	23.95 %	36.02 %	30.38 %	-	9.63 %

El producto final se rehidrató (20.23 g/100 ml de agua) reposando 24 horas. La fórmula se mantuvo estable, su fluidez al pasar por una sonda nasogástrica de 2.5 mm de diámetro es excelente. La osmolaridad que presentó fué de 324 mOsm/l. El sabor es dulce y agradable.

El análisis microbiológico de la fórmula en polvo indica:

Salmonella spp.: negativa

Hongos y levaduras: negativo

Coliformes : menor a 10 UFC/g de muestra

Mesófilos aerobios: 11000 UFC/g de muestra

Estos resultados cumplen con la norma de leche para lactantes (NOM F-218, 1971) la cual especifica que la leche para lactantes debe contener microorganismos patógenos;

la cuenta normal de mesófilos aerobios no debe de ser mayor de 15000 UFC/ g (en agar triptona glucosa extracto de levadura) y la cuenta de coliformes no debe de ser mayor a 10 UFC/g (en agar bilis-rojo-violeta).

A pesar de que en el pollo crudo existe Salmonella spp., ésta se elimina con la cocción y no se presenta a lo largo del proceso.

El precio de la fórmula es bajo si se compara con los precios de otras fórmulas infantiles existentes en el mercado (Cuadro 23).

Cuadro 23. Costo de fórmulas infantiles por Kg de proteínas.

Fórmula	Productor	Costo N\$/Kg de proteína*
Vivonex	Promeco	2600
Pregestimil	Mead Johnson	955
Nutramigen	Mead Johnson	949
Isomil	Abbot Lab.	488
ProSobee	Mead Johnson	406
Fórmula de pollo	-	127

* Costos estimados de acuerdo a precios de venta al público en Marzo de 1993.

VI. CONCLUSIONES.

1. Se logró estabilizar la fórmula original mediante una hidrólisis parcial de la proteína de pollo y un proceso de homogenización. Las condiciones óptimas de hidrólisis para obtener una emulsión estable fueron: enzima Neutrasa (Novo Nordisk, Dinamarca) al 0.10 % con respecto al sustrato (pechuga de pollo cocida al 6 %), a 50 °C y 40 minutos. A diferencia de la fórmula con el pollo cocido sin hidrolizar, la emulsión no presentó separación de fases ni cremado.

2. Para lograr la emulsión fue necesario emplear lecitina de soya, emulsificante natural permitido para la elaboración de alimentos para lactantes. La concentración mínima de lecitina utilizada para lograr la emulsión fue de 0.33 %. Este componente, aunado a la hidrólisis enzimática, permiten estabilizar la formulación sin necesidad de recurrir al uso de gomas, que de no ser digeribles, podrían depositarse en las paredes intestinales y posteriormente impedir una buena absorción de nutrimentos en los niños desnutridos.

3. El uso de maltodextrinas como sustituto parcial de sacarosa permitió disminuir la osmolaridad de la fórmula.

4. El homogeneizado seco por aspersión, permitió obtener un producto en polvo de color amarillo claro, de fácil rehidratación, con una buena estabilidad una vez rehidratado, que fluye adecuadamente por la sonda de alimentación enteral; de sabor dulce y agradable. El

polvo no presentó Salmonella, hongos ni levaduras. Por otro lado su cuenta en placa es baja y cumple con la norma de leche para lactantes.

VII. RECOMENDACIONES.

- **Realizar pruebas biológicas a la fórmula a fin de determinar su valor nutricional.**
- **Realizar pruebas clínicas y comparar los resultados con los que se tenían anteriormente en el Hospital Infantil de México.**
- **Realizar pruebas de vida de anaquel del producto: analisis proximales, microbiológicos.**
- **Estimar el costo de la fórmula y del proceso.**

IX. BIBLIOGRAFIA.

- Adler Nissen J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Pub. London.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 1985. Association of Official Agricultural Chemistry 11 th.edition. Published by AOAC. Inc., EUA.
- Appendini E. 1992. Elaboración y evaluación nutricional de un alimento para niños con intolerancia a la lactosa. Tesis. Facultad de Química, UNAM.
- Badui D.S. 1981. Química de los Alimentos. Ed. Alhambra. México. p.136, 376, 384.
- Burgeois C.M., Leroux P. 1986. Proteínas animales. Extractos, concentrados y aislados en la alimentación humana. El Manual Moderno. México. p. 80-82.
- Britten M., Giroux H.J., 1991. "Coalescence index of protein- stabilized emulsions". J. Food Sci. 56:792-795.
- CODEX ALIMENTARIUS, 1981. Norma para lactantes y niños. CAC. Vol. IX. Ed. 1.
- Coello R.P. 1988. "Diarrea de evolución prolongada" en Enfermedades diarreicas en el niño. Ediciones médicas del Hosp. Infan.(Méx)9a. edición. Cap.24. p. 257-265.
- Coello R.P., Barniol Z.J. 1976. " Alimentación parenteral en niños con diarrea prolongada e intolerancia a monosacáridos." Bol.Méd.Hosp.Infan.(Méx). 33:31-50.
- Coello R.P., 1980. "Intolerancia a los azúcares" en Mizrahi M.L. Infecciones entéricas. Fisiopatología y tratamiento de sus complicaciones. Ed. El Manual Moderno.México. p. 51-60.
- Charalambous G., Doxastikis G. 1989. Developments in Food Science-19 ,Food emulsifiers, Chemistry, technology, functional properties and applications. Elsevier Applied Science Pub. London. p.1-8, 114-132, 199-202.
- Chávez A. , Martínez C., Martínez H. 1990. Nutrición y Comunidad. INN. México.
- Del Valle C.F.,Clifi H.F., Escobedo M. 1980. " Utilidad de una fórmula a base de avena de soya y avena en la alimentación infantil. Balance de nitrógeno." Bol.Hosp.Infan.(Méx). 37:1113-
- Fomon S.J. 1976. Nutrición Infantil. Ed.Interamericana.2a.ed. México. p.359-366.

- Fennema O.R. Food Chemistry. 1985. Marcel Dekker Inc. New York. Second edition. p. 166-300.
- Frenk S. 1989. " Adaptación metabólica en la desnutrición." Cuad. Nutr. 12:17-32.
- Galluzzo S.J., Regenstein J.M. 1978 a. " Emulsion capacity and timed emulsification of chicken breast muscle myosin." J. Food Sci. 43:1757-1760.
- Galluzzo, Regenstein. 1978 b. " Role of chicken breast muscle proteins in meat emulsion formation: myosin, actin and synthetic actomyosin." J. Food Sci. 43:1761-1765.
- Galluzzo, Regenstein. 1978 c. " Role of chicken breast muscle proteins in meat emulsion formation: natural actomyosin, contracted and uncontracted myofibrils." J. Food Sci. 43:1766-1770.
- Ganong W.F. 1974. Manual de Fisiología Médica. El Manual Moderno. 4a. edición. México. p. 394-400, 417-418.
- Gómez F. 1946. "Desnutrición." Bol.Méd.Hosp.Infan.(Méx). 3:543-551.
- Hegarty J.E., Fairclough P.D., Moriarty K.J., Kelly M.J.,Clarck M.L. 1982. " Effects of concentration on in vivo absorption of a peptide containing protein hydrolysate." Gut, 23:304-309.
- Herrera A.E., Vega F.L. 1987. " Estudios de balance en niños desnutridos, convalecientes de diarrea, empleando tres fórmulas dietéticas." Bol.Méd. Hosp.Infan.(Méx), 44:207-213.
- Jirapinyo P.,Young C.,Srimaruta N., Rossi M.T.,Cardano A.,Lebenthal E. 1990. "High-fat semielemental diet in the treatment of protracted diarrhea of infancy." Pediatrics. 86:902-907.
- Jones J.M. 1988. "Poultry- The versatile food: en Hudson B.J.F, Developments in Food Proteins-6. B.J.F Elsevier Applied Science. London. p.35-71.
- Kempe H. Silver H. Obrien D. 1983. Diagnóstico y Tratamientos Pediátricos. El Manual Moderno. 5a ed. México. p. 98-99.
- Kleinman R.E., Galeano N.F., Ghishan F.,Lebenthal E., Sutphen J.,Ulshen M.H. 1989. "Nutritional management of chronic diarrhea and/or malabsorption." J. Pediatr. Gastroenter. Nutr. 9:407-415.
- Kumate J. 1988. "Morbilidad y mortalidad por diarreas en México" en Enfermedades diarreicas en el niño. Ediciones médicas del Hosp.Inf.Méx. 9a. edición. Cap.2. p.11-19.

- Lanata F.C., Black R.E. 1988. "El problema mundial de las diarreas" en Enfermedades diarreicas en el niño. Ed. Med. Hosp. Inf. (Méx) 9a. edición. Cap. 1. p.3-9.
- Lara P. 1990. Desarrollo de un alimento bajo en fenilalanina. Tesis de Maestría. Fac. de Química, UNAM. México.
- Larracilla A.J. 1989. "Alimentación por vía parenteral en el niño con desnutrición proteínica energética." Gaceta Médica de México. 125:17-21.
- Lowry D.H., Rosenbrough M.J., Farr A., Randall R.J. 1951.
"Protein measurement with the Folin-phenol reagent" J. Biol. Chem. 183:265-275.
- McLaren D.S. 1983. La Nutrición y sus Transtornos. Ed. El Manual Moderno. México. p.115-125.
- Mendoza H., Reyes D., Sánchez A. 1987. "Alimentación de niños lactantes con diarrea crónica o recurrente con un hidrolizado de lactoalbúmina en forma ambulatoria." Arch. Dom. Ped. 23:9-11.
- Mora J.O. 1983. "Etiología de la desnutrición infantil: el papel de la enfermedad diarreica." GEN, 37:124-145.
- Morrisey P.A., Mulvihill D.M., O'neill M.O. 1982. "Functional properties of muscle proteins". en Hudson B.J.F., Developments in Food Proteins-5. Elsevier Applied Science. London. p.195-245.
- Nurko S., García A.J., Arvizu S., Pérez Z.M., Covarrubias M.M., Sishbein S.E., Tussaint M.G., Gutierrez C.E. 1990. "Uso de la dieta transicional de pollo en el manejo inicial de los niños con desnutrición severa y diarrea crónica". XXII Congreso Nacional de Pediatría. Mexico.
- Nurko S., García Aranda J.A., Pérez Z.M., Arvizu M.S., Covarrubias M.M., Sishbein S.E., Tussaint M.G., Gutierrez C.E. 1993. "A comparative study of three diets for the nutrition rehabilitation of severely malnourished children." Gastroenterology. 104:A638.
- Phillips R.D., Beuchat L.R. 1981. "Enzyme modification of proteins." en Cherry J.P. Protein Functionality in Foods. Symposium series 147. Am.Chem.Soc. Washington, D.C. p. 275-295.
- Pizarro T.D. 1988. "Rehidratación oral y parenteral" en Enfermedades diarreicas en el niño. Ediciones Medicas del Hosp. Infan. (Méx).9a. Edición. Cap. 36. p.383-389.
- Price J.F., 1976. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Ed. Acribia. España. p.85.

- Ramos G.R., Marino A. 1977. " Nuevos aspectos en la clasificación del estado de nutrición." Bol.Méd.Hosp.Infan.(Méx), 34:357-367.
- Romer H. 1982. "Composición del homogeneizado de pollo utilizado en Caracas." GEN, 36:117-119.
- Romer H., Guerra M., Piña J. Urrestarazu M., García D., Blanco M. 1991. "Realimentation of dehydrated children with acute Diarrhea: Comparison of cow's milk to a chicken-based formula." J.Pediatr. Gastroenter. Nutr. 13:46-51.
- Romer H. 1983. "Alteraciones del tracto digestivo del niño desnutrido." GEN, 37:146-156.
- Saterlee L.A., Chang K.C., 1984. Protein Deterioration. Food development. Nov. p.50-53.
- Sepúlveda J. 1988. " Desnutrición y diarreas" en Enfermedades diarreicas en el niño. Ediciones médicas del Hospital Infantil de México. 9a. Edición. Cap. 28 p. 313-315.
- Smith.D.M., Brekke C.J. 1985. "Enzymatic modification of the structure and functional properties of mechanically deboned fowl proteins". J. Agric. Food Chem. 33: 631-637.
- Somogyi M., 1930. "A method for the precipitation of blood filtrates for the estimation of sugar." J. Biol. Chem. 86:655.
- Sotelo A., Hernández M., Larracilla J., Arenas M., Palapa E. 1987, "Utilización del garbanzo (Cicer arietinum) en fórmulas no lácteas II. Balance de nitrógeno en niños con intolerancia a la lactosa, alimentados con una fórmula a base de garbanzo y un producto comercial de soya". Arch. Lat. Nutr. 37: 468-479.
- Stadelman W.J., Olson V.M., Shemwell G.A., Pasch S. 1988. Egg and poultry processing. VCH. England. p. 92-122.
- Vega F.L., Yepes P.N., Sepúlveda H.M., Calva R.R. 1988. " La dieta elemental en la recuperación inicial de la desnutrición grave." Gaceta Médica de México. 124:99-105.
- Vega F.L., Carbajal G.A., García A.J. 1982. "Alimentación enteral continua en niños lactantes empleando una dieta elemental." Bol. Med.Hosp. Infan.(Méx), 39:651-658.
- Whitaker J.R. Tannenbaum S.R. 1977. Food Proteins. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut.

A N E X O 1

A N E X O 2

TITLE 'hidrolisis enzimatica',
 SUBTITLE 'Neutrase',
 DATA LIST F1=1,2,3,4-7,
 FORMATS D (F1,2),
 DISPLAY.

 Page 2 Hidrolisis enzimatica
 Neutrase
 T - # No label #
 C - # No label #
 R - # No label #
 D - # No label #

VARIABLE LABELS t 'tiempo'
 c 'concentration'
 r 'replicas'
 d 'observaciones'.
 VALUE LABELS t 1 '40' 2 '80' 3 '120' 4 '240'
 c 1 '0.10' 2 '0.25' 3 '0.50' 4 '1.00'

BEGIN DATA.
 ** cases are written to the uncompressed active file

This procedure was completed at 16:27:10
 DISPLAY.

 Page 3 Hidrolisis enzimatica
 Neutrase
 T - tiempo
 C - concentration
 R - replicas
 D - observaciones

LIST.

 Page 4 Hidrolisis enzimatica
 Neutrase

T	C	R	D	T	C	R	D
1	1	1	4.00	3	2	1	3.00
1	1	2	4.00	3	3	1	3.30
1	2	1	4.00	3	3	2	3.30
1	2	2	4.00	3	4	1	3.30
1	3	1	3.30	3	4	2	3.30
1	3	2	3.30	4	1	1	3.00
1	4	1	3.30	4	1	2	3.30
1	4	2	3.30	4	2	1	3.00
2	1	1	4.00	4	2	2	3.00
2	1	2	4.00	4	3	1	3.00
2	2	1	2.70	4	3	2	3.00
2	2	2	2.70	4	4	1	3.30
2	3	1	2.70	4	4	2	3.30
2	3	2	3.00				
2	4	1	3.30				
2	4	2	3.30				
3	1	1	3.30				
3	1	2	3.30				
3	2	1	3.00				
3	2	2	3.00				

Number of cases read = 33 Number of cases listed = 33

This procedure was completed at 16:27:58
DNEWAY / VARIABLES G 2 1 (1,4) / RANGES DUNCAN / POLYNOMIAL 3 / STATISTICS ALL.

----- D N E W A Y -----

Variable C observaciones
EX Variable T tiempo

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	1.3675	.4558	3.7543	.0214
Linear Term	1	1.0240	1.0240	8.5017	.0004
Deviation from Linear	2	.3435	.1717	1.4259	.2572
Quad. Term	1	.2113	.2113	1.7539	.1941
Deviation from Quad.	1	.1522	.1522	1.2584	.2627
Within Groups	28	5.5725	.1990		
Total	31	6.9400			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95% Conf Int	for Mean
Grp 1	8	3.6500	.3742	.1323	3.3372	To 3.9628
Grp 2	8	3.2125	.5463	.1931	2.7558	To 3.6692
Grp 3	8	3.2250	.1389	.0491	3.1089	To 3.3411
Grp 4	5	3.1125	.1553	.0549	2.9827	To 3.2423
Total	29	3.3000	.3910	.0691	3.1590	To 3.4410
Fixed Effects Model			.3471	.0614	3.1743	To 3.4257
Random Effects Model				.1194	2.9202	To 3.6798
Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance						.0415

Page 9 Hidrolisis enzimatica
Neutrase

6/4/93

Grp	Minimum	Maximum
Grp 1	2.3000	4.0000
Grp 2	2.7000	4.0000
Grp 3	3.0000	3.3000
Grp 4	3.0000	3.7000
Total	2.7000	4.0000

Test: For Homogeneity of Variances

Cochran's C = Max. Variance/Sum(Variations) = .6193, P = .009 (4630...)
Bartlett-Bok F = 5.296, P = .001
Maximum Variance / Minimum Variance 15.472

Page 10 Hidrolisis enzimatica
Neutrase

6/4/93

----- D N E W A Y -----

Variable 0 observaciones
By Variable 1 tiero

Multiple Range Test

Duncan Procedure
Ranges for the .050 level -

2.89 3.14 3.14

The ranges above are table ranges.
The value actually compared with $Mean(J) - Mean(I)$ is:
.2454 * Range * $\sqrt{0.5(N(I) + 1)/N(I)}$

(*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

Page 11 Hidrolisis enzimatica
Neutrase

6/4/93

		0 0 0 0
		0 0 0 0
		0 0 0 0
Mean	Group	4 2 0 1
3.1125	Grp 1	
3.2125	Grp 2	
3.3250	Grp 3	
3.6500	Grp 4	* * *

homogeneous subsets (Subsets of groups whose highest and lowest means do not differ by more than the critical significant range for a subset of that size.)

SUBSET 1

Group	Grp 4	Grp 5	Grp 3
Mean	3.1125	3.2125	3.2250

 Page 12 Hydrolysis enzymatica 6/4/93
 Neutrase

SUBSET 2

Group	Grp 1
Mean	3.2500

 Page 13 Hydrolysis enzymatica 6/4/93
 Neutrase

 This procedure was compiled at 14:29:27
 ONEWAY /VARIABLES = E * C (1,4) /RANGES DUNCAN /POLYNOMIAL 3/STATISTICS ALL

 Page 14 Hydrolysis enzymatica 6/4/93
 Neutrase

----- O N E W A Y -----

Variable 7 observations
 EV Variable 0 concentration

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	1.1375	.3958	7.1199	.0418
Linear Term	1	.4000	.4000	7.1577	.0267
Deviation from Linear	2	.7375	.3937	7.1034	.0606
Quad. Term	1	.7813	.7813	14.1374	.0194
Deviation from Quad.	1	.0062	.0062	.1173	.8260
Within Groups	28	7.5525	.2697		
Total	31	8.6900			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95% CI for Mean	CI for Mean
Grp 1	8	3.6125	.4377	.1505	3.3569	3.8684
Grp 2	8	3.7750	.3233	.1155	3.5359	4.0140
Grp 3	8	3.1125	.3273	.1165	2.8559	3.3691
Grp 4	8	3.7000	.4000	.1414	3.3900	4.0100
Total	32	3.3000	.3791	.0681	3.1590	3.4410
Factor Effects Model			.3552	.0630	3.1710	3.4290
Random Effects Model				.1112	3.2481	3.4529
Random Effects Model - Estimate of Between-Component Variance						.0336

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	3.0000	4.0000
Grp 2	3.7000	4.0000
Grp 3	2.7000	3.5000
Grp 4	3.5000	4.0000
Total	2.7000	4.0000

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C = Max. Variance / Sum Variance = .5347, P = .047 (Adjusted)
 Satterthwaite F = 1.185, P = .117
 Maximum Variance / Minimum Variance = 1.542

----- C N E X A Y -----
 A Variable D observaciones
 B Variable C concentracion

Multisite Range Test

Duncan Procedure
 Ranges for the .050 level =

2.69 3.04 3.14

The ranges above are table ranges.
 The value actually compared with Mean(J) - Mean(I) is:
 .2519 + Range # Sort(1/4 I) - 1/N(J)

* Indicates pairs of means significantly different at the .050 level

Page 16 Hidrolisis enzimatica
Neutrase

6/4/73

5 5 5 5
r r r r
o o o o

Mean Group 7 0 1 1
3.1125 Gro 3
3.1750 Gro 2
3.3000 Gro 4
3.6125 Gro 1

Homogeneous Subsets: Subsets of groups whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of their size.

SUBSET 1

Group Gro 3 Gro 2 Gro 4
Mean 3.1125 3.1750 3.3000

Page 17 Hidrolisis enzimatica
Neutrase

6/4/73

SUBSET 2

Group Gro 4 Gro 1
Mean 3.3000 3.6125

Page 20 Hidrolisis enzimatica
Neutrase

6/4/73

This procedure was completed at 12:04:07
ANOVA / VARIABLES 0 BY 4 (1,4) : 1,4 / OPTION 4/STATISTICS ALL.

ANOVA PROGRAM REQUIRES 32768 BYTES OF MEMORY.

Page 21 Hidrolisis enzimatica
Neutrase

6/4/73

*** CELL MEANS ***

0 observaciones
BY 1 tiempo
C concentracion

TOTAL POPULATION

3.30
(SD)

1 2 3 4
3.45 3.21 3.33 3.11
(S) (S) (S) (S)

		1	2	3	4
T	1	4.00 (2)	4.00 (2)	3.30 (2)	3.30 (2)
	2	4.00 (2)	2.70 (2)	2.85 (2)	3.30 (2)
	3	3.50 (2)	3.00 (2)	3.30 (2)	3.30 (2)
	4	3.15 (2)	3.00 (2)	3.00 (2)	3.30 (2)

*** ANALYSIS OF VARIANCE ***

BY O observaciones
T tiempo
C concentracion

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Sig. of F
Main Effects	2.555	6	.426	75.704	.000
T	1.367	3	.456	81.037	.000
C	1.187	3	.396	70.370	.000
2-way Interactions	2.095	9	.233	41.383	.000
T	2.095	9	.233	41.383	.000

Explained	4.650	15	.310	55.111	.000
Residual	.090	16	.006		
Total	4.740	31	.153		

32 Cases were processed.
0 CASES (.0 PCT) were missing.

*** MULTIPLE CLASSIFICATION ANALYSIS ***

	Bv	D	T	C	observaciones	tiempo	concentracion
Grand Mean =					3.500		
Variable + Category	N	Unadjusted Dev'n	Ests	Adjusted For Independence Dev'n	Ests	Adjusted For Independence Dev'n	Ests
T							
1 40	8	.35		.35			
2 80	8	-.09		-.09			
3 120	8	-.07		-.07			
4 240	8	-.19		-.19			
			.54			.14	

*** MULTIPLE CLASSIFICATION ANALYSIS ***

	Bv	D	T	C	observaciones	tiempo	concentracion
Grand Mean =					3.500		
Variable + Category	N	Unadjusted Dev'n	Ests	Adjusted For Independence Dev'n	Ests	Adjusted For Independence Dev'n	Ests
C							
1 0.10	8	.31		.31			
2 0.25	8	-.12		-.12			
3 0.50	8	-.15		-.15			
4 1.00	8	.00		.00			
			.50			.17	

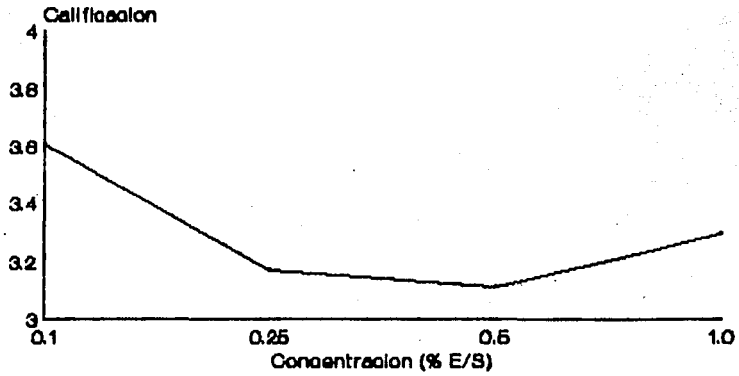
Multiple R Squared

Multiple F

.555

.771

Efecto de la concentración



Efecto del tiempo

