

MÉTODOS EMPLEADOS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

Locación del estudio

Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba (Provincia del Chimborazo). República del Ecuador.

Diseño general de la investigación

La investigación se orientó a encontrar la mejor combinación cereal:leguminosa para 8 alimentos, a saber: *Cereales*: Arroz, Trigo, Avena, Maíz; y *Leguminosas*: Chocho, Arveja, Lenteja, Frijol; mediante un diseño factorial 4 x 4. La Tabla 1 muestra las combinaciones preparadas como parte de la presente investigación. Se previeron 16 combinaciones cereales x leguminosas posibles. Adicionalmente, la mezcla alimenticia en cada combinación cereal:leguminosa se preparó según 9 proporciones C:L diferentes, con C = 1, 2, ..., 9 vs. L = 9, 8, ..., 1. Se previeron así $4 \times 4 \times 9 = 144$ combinaciones.

El diseño factorial se expandió para incluir 16 combinaciones cereales x leguminosas preparadas en una proporción C:L 2:1 (esto es: 2 partes de cereales por cada parte de leguminosas). Esta proporción ha sido tenida históricamente como óptima aminoacídicamente.¹

La calidad biológica de la combinación cereal:leguminosa de las diferentes mezclas alimenticias se evaluó mediante el puntaje (léase también cómputo) aminoacídico. La composición aminoacídica de la mezcla cereal:leguminosa se contrastó con el patrón propio de la proteína de referencia de la FAO/OMS/UNU. La mejor calidad aminoacídica de la combinación cereal:leguminosa se definió como aquella con la menor desviación respecto de la mezcla de referencia 2:1.

Procedimientos de la investigación

Adquisición de los alimentos: Los alimentos fueron adquiridos en el mercado local como harinas molidas. Aquellos que no estuvieron disponibles, fueron adquiridos en forma de granos, y se molieron en el laboratorio para obtener las correspondientes harinas. Las mezclas cereales:leguminosas se prepararon según el esquema factorial expuesto en la Tabla 1 después de pesar las cantidades correspondientes de los ingredientes y mezclarlos hasta la homogeneidad.

Determinación del contenido de nitrógeno alimenticio: El contenido de nitrógeno de los diferentes ingredientes, y las mezclas resultantes, se determinó mediante el método de Kjeldahl²⁻³ en el laboratorio de pertenencia de la autora. Brevemente, la muestra se digirió con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores para transformar el nitrógeno presente en la misma (en su mayor parte orgánico) en sulfato amónico (nitrógeno amoniacal). Completado el tiempo de digestión, la muestra se alcalinizó mediante la adición de hidróxido de sodio concentrado. El nitrógeno obtenido se destiló en forma de amoníaco dentro de una corriente de vapor de agua. El amoníaco desprendido se recuperó en presencia de un exceso de ácido para

formar sulfato de amonio. Finalmente, el exceso de ácido se valoró mediante la adición de álcali para obtener la cantidad de nitrógeno presente en la muestra.

Determinación del contenido de proteínas: El contenido determinado de nitrógeno en la muestra de ensayo se convirtió en contenido de proteína después de multiplicación por los factores definidos por la FAO/OMS/UNU. La Tabla 2 muestra tales factores de conversión.

Adicionalmente, el contenido de proteínas se determinó mediante la reacción de Biuret en el laboratorio de pertenencia de la autora.⁴

Tabla 1. Diseño general del experimento.

Cereal	Leguminosa	Mezcla	Mezcla de ensayo [¶]								
			2:1	1:9	2:8	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	8:2
Arroz	Arveja	AA	AA1	AA2	AA3	AA4	AA5	AA6	AA7	AA8	AA9
	Chocho	ACH	ACH1	ACH2	ACH3	ACH4	ACH5	ACH6	ACH7	ACH8	ACH9
	Frijol	AF	AF1	AF2	AF3	AF4	AF5	AF6	AF7	AF8	AF9
	Lenteja	AL	AL1	AL2	AL3	AL4	AL5	AL6	AL7	AL8	AL9
Trigo	Arveja	TA	TA1	TA2	TA3	TA4	TA5	TA6	TA7	TA8	TA9
	Chocho	TCH	TCH1	TCH2	TCH3	TCH4	TCH5	TCH6	TCH7	TCH8	TCH9
	Frejol	TF	TF1	TF2	TF3	TF4	TF5	TF6	TF7	TF8	TF9
	Lenteja	TL	TL1	TL2	TL3	TL4	TL5	TL6	TL7	TL8	TL9
Avena	Arveja	AVA	AVA1	AVA2	AVA3	AVA4	AVA5	AVA6	AVA7	AVA8	AVA9
	Chocho	AVCH	AVCH1	AVCH2	AVCH3	AVCH4	AVCH5	AVCH6	AVCH7	AVCH8	AVCH9
	Frejol	AVF	AVF1	AVF2	AVF3	AVF4	AVF5	AVF6	AVF7	AVF8	AVF9
	Lenteja	AVL	AVL1	AVL2	AVL3	AVL4	AVL5	AVL6	AVL7	AVL8	AVL9
Maíz	Arveja	MA	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA7	MA8	MA9
	Chocho	MCH	MCH1	MCH2	MCH3	MCH4	MCH5	MCH6	MCH7	MCH8	MCH9
	Frejol	MF	MF1	MF2	MF3	MF4	MF5	MF6	MF7	MF8	MF9
	Lenteja	ML	ML1	ML2	ML3	ML4	ML5	ML6	ML7	ML8	ML9

[‡] Mezcla recomendada debido a la (percibida) superior calidad aminoacídica.

[¶] Con variaciones según el primer aminoácido limitante, esto es: aquel cuya deficiencia es la mayor para el grupo etario de estudio.

Fuente: Elaboración propia de la autora.

Determinación del contenido de aminoácidos esenciales: El contenido de lisina, metionina + cistina, treonina, triptófano e histidina tanto en los ingredientes de las mezclas como en las mezclas resultantes se determinó según el contenido de nitrógeno de la muestra de ensayo:

Contenido de aminoácidos =

$$\frac{\text{miligramos del aminoácido por cada gramo de nitrógeno}}{\text{Contenido total de aminoácidos en 100 gramos del alimento}} \times 100 \quad [1]$$

Igualmente, el contenido de aminoácidos del alimento (ingrediente vs. mezcla final) se expresó como miligramos de aminoácidos por cada gramo de proteínas.

Tabla 2. Factores de conversión empleados en la determinación del contenido de proteínas de los ingredientes de las mezclas, y de las mezclas finales.

Alimento	Factor de conversión
Huevo entero	6.25
Trigo entero	5.83
Arroz y harina de arroz	5.95
Avena	5.83
Maíz	6.25
Frijoles	6.25
Arveja	6.25
Chocho	6.25
Lenteja	6.25

Fuente: Referencia [5].

Determinación del puntaje aminoacídico: El puntaje aminoacídico de tanto los ingredientes como las mezclas finales de cereales:leguminosas se determinó por contrastación con el patrón de referencia.⁶

El puntaje aminoacídico de la muestra de ensayo se obtuvo como el promedio aritmético de las cantidades de aminoácidos presentes en la muestra de ensayo después de corrección para las existentes en contenidos similares de nitrógeno de la proteína de referencia:

$$\text{Puntaje aminoacídico} = \frac{\text{mg de AA en 1 g de N de la muestra de ensayo}}{\text{mg de AA en 1 g de N de la proteína de referencia}} \quad [2]$$

Para cada muestra de ensayo se definió también el primer aminoácido limitante como se muestra a continuación:

$$\text{Valor biológico} = \frac{\text{mg del AA esencial más escaso en la muestra de ensayo}}{\text{mg del AA esencial en la proteína de referencia}} \times 100 \quad [3]$$

Evaluación económica de las mezclas de proteínas: Se estimó el costo de producción de un kilogramo de tanto de los ingredientes empleados en la obtención de las mezclas alimenticias, como de las mezclas finales. Para ello, se tuvieron en cuenta el precio de adquisición de un kilogramo del alimento en el mercado, y las cantidades de proteínas presentes en un kilogramo del alimento (sea éste el ingrediente o la mezcla final).

Para la obtención del costo de producción de un kilogramo de proteínas de los ingredientes alimenticios consumidos se empleó la matriz de cálculo siguiente:

Costo de 1 kilogramo del alimento	
Precio de adquisición de un kilogramo del alimento en el mercado	(1)
Contenido de proteínas en 100 gramos del alimento	
• Fuente: FAO (1970, 1072, 1981) Disponible en: http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/ac854t00.htm	(2)
• Fuente: Tabla de composición de alimentos ecuatorianos Instituto de Nutrición. Quito: 1965	(3)
• Fuente: Presente investigación Valores estimados localmente a partir del contenido de nitrógeno total	(4)
Contenido de proteínas en 1 kilogramo del alimento:	
Proteína contenida en 100 gramos del alimento x 10	(5)
Costo de 1 gramo de proteínas = Fila 1 / Fila 5	(6)
Costo de 1 kilogramo de proteínas = Fila 6 x 100	(7)

Para la obtención del costo de producción de un kilogramo de proteínas de la mezcla alimentaria se definió la mejor mezcla como aquella proporción cereales:leguminosas con el puntaje aminoacídico superior. Así:

Mejor mezcla: Proporción cereales:leguminosas con el mejor puntaje aminoacídico	(1)
Costo de un gramo de proteína aportada por el cereal:	
Proporción empleada de cereal x Costo de 1 gramo de proteínas	(2a)
Costo de un gramo de proteína aportada por la leguminosa:	
Proporción empleada de leguminosa x Costo de 1 gramo de proteínas	(2b)
Costos totales de 1 gramo de proteínas: Fila 2a + Fila 2b	(3)
Costo de un kilogramo de proteínas:	
Costo total de 1 gramo de proteínas x 1000	(4)

Procesamiento de los datos y análisis estadístico-matemático de los resultados: Los datos obtenidos en cada instancia del diseño experimental de la presente investigación se vaciaron en un contenedor digital construido con EXCEL para OFFICE de WINDOWS (Microsoft, Redmon, Virginia, Estados Unidos).

Las diferencias entre los puntajes aminoacídicos de las mezclas obtenidas respecto de la mezcla de referencia 2:1 se examinaron mediante un test de homogeneidad basado en la distribución ji-cuadrado. El estadígrafo χ^2 obtenido se corrigió según Yates.⁷

Las diferencias entre las distintas mezclas respecto del contenido de proteínas se estimaron mediante un análisis de varianza con ordenación unilateral (ADEVA),⁸ según la ecuación [4]:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \epsilon_{ij} \quad [4]$$

En la ecuación [4]: Y_{ijk} : Valor estimado del contenido de proteínas; μ : Contenido promedio de proteínas en la muestra; T_i : Contenido de proteínas del patrón de referencia (según la FAO/OMS/UNU o la “Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos y de Alimentos”); y ϵ_{ij} : Error experimental; respectivamente.

La Tabla 3 recoge el esquema ADEVA empleado en la evaluación de las diferencias entre las mezclas respecto del contenido de proteínas totales. En caso de diferencias significativas, se recurrió a la prueba de rangos múltiples de Duncan para aislar la influencia de los factores y las interacciones.⁹

Tabla 3. Esquema seguido en el Análisis de Varianza con ordenación unilateral para la obtención del contenido de proteínas totales de la mezcla alimenticia. Para más detalles: Consulte la presente Sección.

Referencia	Código	Número de determinaciones
Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	FAO	1
Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos	TCAE	1
<i>Cereales investigados</i>		
• Arroz	CAR	3
• Trigo	CTR	3
• Avena	CAV	3
• Maíz	CMA	3
<i>Leguminosas investigadas</i>		
• Arveja	LAR	3
• Chocho	LCH	3
• Frijol	LFR	3
• Lentejas	LLE	3

Fuente: Elaboración propia de la autora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bressani R. Protein complementation of foods. En: Nutritional evaluation of food processing. Springer. Dordrecht: 1988. pp 627-657.
2. Kjeldahl J. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern [New method for the determination of nitrogen in organic substances] Zeitschrift Analytische Chemie 1883;22(1):366-83.
3. Gibson RB. The determination of nitrogen by he Kjeldahl method. J Am Chem Soc 1904;26 (1):105-10.
4. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193(1):265-75.

5. FAO/WHO. Energy and protein requirements: Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. WHO Technical Report Series number 522. Geneva: 1973.
6. Schaafsma G. The protein digestibility-corrected amino acid score. *J Nutr* 2000;130(7 Suppl): S1865-S1867.
7. Campbell I. Chi-squared and Fisher-Irwin tests of two-by-two tables with small sample recommendations. *Stat Med* 2007;26:3661-75.
8. Kass RE, Eden UT, Brown EN. Analysis of variance. En: *Analysis of Neural Data*. Springer. New York NY: 2014. pp. 361-389.
9. Duncan DB. A significance test for differences between ranked treatments in an analysis of variance. *Var J Sci* 1951;2:171-89.