

Original

Evaluación biológica de la calidad de una mezcla de proteínas para uso en nutrición enteral

J. Olza Meneses*, J. Porres Foulque**, G. Urbano Valero**, E. Martínez de Victoria** y A. Gil Hernández*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. **Departamento de Fisiología. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Granada. España.

Resumen

La nutrición enteral (NE) es el mejor recurso para complementar la alimentación de los pacientes, siempre que el tracto gastrointestinal este funcional. Cuando se indica NE total, ésta representa la fuente exclusiva de alimento, por lo que es importante asegurar un alto valor biológico de la proteína incluida.

Objetivo: Valorar la calidad biológica de una mezcla proteica constituida por 50% de caseinato potásico, 25% de proteínas de suero lácteo y 25% de proteína de guisante para ser utilizada en productos de nutrición enteral.

Material y métodos: 40 ratas Wistar (20 hembras y 20 machos), con peso medio de 51 g, divididas en cuatro grupos. Dos de ellos fueron alimentados con dietas específicas para ratas: uno con caseína (Control) y otro con la proteína experimental (Experimental); los otros fueron alimentados con productos de NE diseñados para humanos y adaptados a los requerimientos de las ratas (Normoproteico e Hiperproteico), durante 10 días. Se determinó el índice de eficacia proteica (PER), el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA), la relación nitrógeno retenido/absorbido (R/A) y la relación nitrógeno retenido/ingerido (R/I).

Resultados: El grupo experimental y el grupo control presentaron valores similares en todos los índices analizados. Asimismo, estos índices fueron similares entre los grupos normo e hiperproteicos, pero menores respecto a los grupos anteriores, exceptuando al PER, el cual fue a su vez similar entre el grupo normoproteico y el control.

Conclusión: La calidad de la mezcla proteica utilizada es alta y adecuada para ser incluida en el desarrollo de nuevos productos para nutrición enteral.

(Nutr Hosp. 2008;23:206-211)

Palabras clave: *Calidad proteica. Nutrición enteral. PER.*

BIOLOGICAL EVALUATION OF A PROTEIN MIXTURE INTENDED FOR ENTERAL NUTRITION

Abstract

Enteral nutrition is the best way to feed or supplement the diet when gastrointestinal tract functions of patients are partially or totally preserved. Whenever total enteral nutrition is needed, it represents the only source of nutrients for patients. Thus, it is mandatory to ensure that high biological value proteins are included in enteral formulae.

Objective: To assess the biological quality of a protein blend constituted by 50% potassium caseinate, 25% whey protein and 25% pea protein intended to be used in enteral nutrition products.

Materials and methods: Forty Wistar rats (20 male and 20 female), with initial body weight of 51 g, were divided into four groups and feed for 10 days with: casein (Control), experimental protein blend (Experimental), lyophilized normo- and hyperproteic enteral nutrition formulae adapted to the animal nutritional requirements (Normoproteic and Hyperproteic). Protein efficiency ratio (PER), apparent digestibility coefficient (ADC), relationship between retained and absorbed nitrogen (R/A) and relationship between retained and consumed nitrogen (R/I) were calculated.

Results: Experimental and control groups had similar values for all analysed indices (PER, ADC, R/A and R/I). These indices were also similar between normo and hyperproteic groups, but lower than experimental and control groups, except in PER, where normoproteic group was either similar to control and hiperproteic group.

Conclusion: The quality of the protein blend used in this study is high. It is a good protein source to be used in the development of new enteral nutritional products.

(Nutr Hosp. 2008;23:206-211)

Key words: *Protein quality. Enteral nutrition. PER.*

Correspondencia: Ángel Gil Hernández.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II.
Facultad de Farmacia.
Campus de Cartuja.
18071 Granada.
E-mail: agil@ugr.es

Recibido: 19-II-2008.
Aceptado: 14-III-2008.

Introducción

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de todas las células del organismo^{1,2}. Los aminoácidos (AA) son los sillares de las proteínas los cuales actúan, además, como precursores de ácidos nucleicos, neurotransmisores y otras moléculas esenciales para la vida. Por lo tanto, un aporte dietético adecuado de proteína es esencial para mantener la integridad y la función celular, y para lograr un buen estado de salud³.

Los requerimientos de AA se expresan en términos de proteína dietética y no como cantidades separadas de cada uno de ellos. En la dieta las proteínas se encuentran formando parte de numerosos alimentos, siendo su composición aminoacídica diferente según la fuente alimentaria. Por lo tanto, dependiendo de la cantidad y tipo de alimento que se consume, se puede llegar o no a alcanzar las recomendaciones de ingesta³.

La calidad nutritiva de una proteína, se define como la capacidad de ésta o de una mezcla de ellas para cubrir los requerimientos de un individuo⁴; depende fundamentalmente de la composición de AA y de la biodisponibilidad de los mismos. Para medir la calidad proteica de un alimento, existen métodos químicos, biológicos y microbiológicos. Dentro de los biológicos se han usado, y se siguen usando, el coeficiente de eficacia proteica (PER), el valor biológico (VB) y la utilización neta proteica (NPU)⁵.

La nutrición enteral (NE) se define como el uso de "alimentos con propósitos médicos" independientemente de la ruta de suministro, la cual puede ser tanto oral, como a través de sondas, vía nasogástrica, naso-enteral o percutánea⁶. La NE es el mejor recurso para alimentar o complementar la alimentación de personas con deficiencias o con alguna patología cuando se conserva total o parcialmente la funcionalidad del tracto gastrointestinal⁷. En la NE total los productos utilizados constituyen la fuente exclusiva de proteínas dietéticas para el paciente por lo que es fundamental asegurar que su valor biológico sea elevado.

El objetivo de este trabajo ha sido valorar la calidad proteica de una mezcla de proteínas constituida por 50% de caseinato potásico, 25% de proteínas de suero lácteo y 25% de proteína de guisante, para ser utilizada en productos de nutrición enteral.

Material y métodos

Diseño experimental

La evaluación de la calidad proteica se realizó a través de un bioensayo, basado en el método diseñado por Thomas-Mitchell⁸ modificado. Esta clase de ensayo utiliza ratas en crecimiento y evalúa la ganancia de peso por gramo de proteína ingerido (PER); se determinó también el coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína (CDA), la utilización metabólica de la proteína calculada a través de la relación nitrógeno

retenido/absorbido (R/A) y la incorporación de la proteína al metabolismo calculada a través de la relación nitrógeno retenido/ingerido (R/I).

El estudio se realizó en dos fases, la primera en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y la segunda en el Servicio de producción y experimentación animal del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de dicha institución. En la primera fase se evaluó la calidad de la mezcla proteica experimental (50% de caseinato potásico, 25% de proteínas séricas lácteas y 25% de proteína de guisante) y se utilizó caseína como proteína control, y en la segunda fase se evaluó un producto de nutrición enteral líquido (T-Diet Plus[®]) a dos concentraciones diferentes de proteína (normoproteico e hiperproteico); para la evaluación el producto se liofilizó y adaptó a las necesidades y requerimientos nutricionales de la rata (tabla I). En ambos casos, se siguieron las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (AIN), basándose en la dieta AIN-93G⁹.

Animales

En cada experimento se emplearon 20 ratas de la raza *Wistar*, recién destetadas de 21 días de vida, 10 machos y 10 hembras divididas en 2 grupos, cada uno de 5 hembras y 5 machos con un rango de peso entre 50 g y 52 g, suministrados por el Servicio de Producción y Experimentación animal del CIC de la Universidad de Granada. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales en una habitación a 23 ± 1 °C y con un fotoperíodo luz-oscuridad de 12 horas. La dieta y el agua fueron suministrados *ad libitum* diariamente. Cada experimento duró 10 días, 3 de adaptación de los animales a la dieta y a las condiciones ambientales y 7 de cuantificación de ingesta sólida, cambios en el peso y recolección de heces y orina.

Tratamiento de las muestras

Las heces recolectadas se congelaron a -20 °C, se liofilizaron y se molieron. La orina se recolectó en una solución de ácido clorhídrico al 5,5% con 0,5% del indicador Xiro-Taxiro para evitar las pérdidas de nitrógeno.

Técnicas analíticas

La determinación de nitrógeno se realizó por el método Kjeldahl, utilizando 0,5 g de heces secas y molidas, 5 ml de orina y 0,5 g de dieta.

Índices biológicos

Se determinaron los siguientes índices para cada grupo: PER = Incremento de peso (g)/Proteína ingerida

Tabla I
Composición porcentual de las dietas consumidas por los animales en los experimentos de evaluación de la calidad proteica de una mezcla de proteínas con un 50% de caseinato potásico, 25% de proteínas de suero lácteo y 25% de proteína de guisante y dos productos para NE que contienen dicha mezcla a diferentes concentraciones, liofilizados y adaptados a los requerimientos de las ratas durante 10 días

| Componentes | Dietas | | | |
|------------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| | Control | Experimental | Normoproteica | Hiperproteica |
| Proteína | 12 (caseína) | 12* | – | – |
| Producto liofilizado normoproteico | – | – | 68,97 | – |
| Producto liofilizado hiperproteico | – | – | – | 56,07 |
| Almidón de maíz | 47,75 | 47,75 | 11,10 | 24 |
| Almidón dextrinado | 13,2 | 13,2 | – | – |
| Sacarosa | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Aceite de soja | 7 | 7 | – | – |
| Celulosa (fibra) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Mezcla mineral AIN-93G-MX | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 |
| Mezcla vitamínico AIN-93-VX | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L-cistina | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 |
| Bitartrato de colina | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Butilhidroquinona (mg) | 0,0014 | 0,0014 | 0,0014 | 0,0014 |
| <i>Nutrientes</i> | | | | |
| Proteínas | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Grasas | 7 | 7 | 11,73 | 9,44 |
| Hidratos de Carbono | 70,95 | 70,95 | 57,93 | 61,12 |
| Fibra | 5 | 5 | 10,11 | 8,84 |
| Vitaminas | 1 | 1 | 1,23 | 1,23 |
| Minerales | 3,5 | 3,5 | 5 | 5 |

* Proteína experimental: 50% caseinato potásico, 25% proteínas séricas lácticas y 25% proteína de guisante.

(g). Es un índice que se utiliza para determinar la calidad proteica en función del aumento de peso del animal.

$$\text{CDA} = \frac{I - H}{I} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{R/A} = \frac{I - (H + O)}{I - H} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{R/I} = \frac{I - (H + O)}{I} \times 100 \quad (3)$$

Donde: I = nitrógeno ingerido; H = nitrógeno fecal; O = nitrógeno urinario

El CDA (1) nos informa de la utilización digestiva de la proteína de la dieta. La digestibilidad aparente no incluye la excreción fecal endógena de nitrógeno. R/A (2) es la relación entre el nitrógeno retenido frente al absorbido. Este índice nos informa de la utilización metabólica de la proteína, teniendo en cuenta su aprovechamiento digestivo. R/I (3) es la relación entre el nitrógeno retenido y el ingerido. Expresa el grado en que la

proteína ingerida se incorpora a la economía corporal, es la proteína consumida y retenida que es utilizada.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Se realizó un análisis de normalidad de todas las variables dependientes consideradas en el estudio mediante el test de Shapiro-Wilk. Todas las variables seguían la normalidad. Para comparar la calidad biológica de la proteína experimental, así como de la mezcla proteica en los productos de NE normo- e hiperproteico con respecto a la proteína control, se utilizó un modelo lineal general univariante (ANOVA 1 vía), con comparaciones entre grupos *a posteriori* mediante el test de Bonferroni. Se tomó como significación estadística $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS 15.0.1.

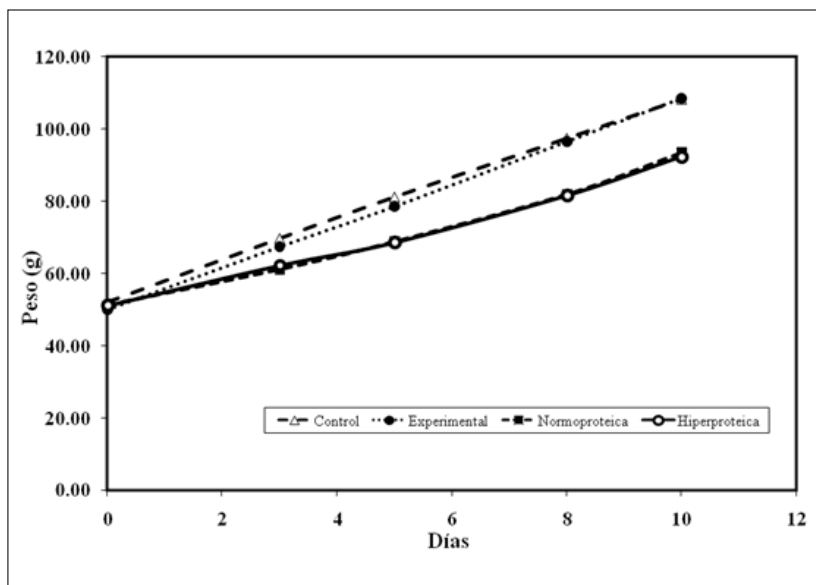


Fig. 1.—Evolución ponderal de los animales en los experimentos de evaluación de la calidad proteica de una mezcla de proteínas con un 50% de caseinato potásico, 25% de suero lácteo y 25% de guisantes y de dos productos para NE que la contienen a diferentes concentraciones, liofilizados y adaptados a los requerimientos de las ratas durante 10 días.

Resultados

Consumo de alimento y evolución ponderal

En la figura 1 se muestra la evolución ponderal de las ratas en los cuatro grupos experimentales teniendo en cuenta tanto el periodo de adaptación como el experimental. Los pesos de los animales al inicio y al final del primer experimento fueron 50,0 g y 108,5 g para el grupo experimental y 52,0 g y 108,4 g para el grupo control. En el segundo experimento, los grupos que recibieron los productos normoproteico e hiperproteico aumentaron desde 51,2 g y 51,1 g, hasta 93,5 g y 92,4 g, respectivamente. El aumento de peso fue mayor cuando se utilizó la mezcla proteica experimental que cuando se utilizaron los productos para nutrición enteral ya elaborados; sin embargo, estadísticamente, el grupo alimentado con la dieta normoproteica creció de manera similar al control.

En la tabla II se muestra el consumo total y medio de alimento y el consumo medio de proteína. Se observó

que la ingesta total de alimento fue similar entre el grupo control y el grupo alimentado con la mezcla proteica experimental y entre el grupo alimentado con el producto normoproteico para nutrición enteral adaptado para las ratas y el hiperproteico. Asimismo, el consumo del grupo control fue similar al del grupo alimentado con el producto hiperproteico adaptado. Por otra parte, el consumo de proteínas fue similar en los cuatro grupos estudiados.

Índices de calidad proteica

En la tabla III, se muestran los índices calculados de calidad de la proteína estudiada, PER, CDA, R/A y R/I. En cuanto al PER es importante destacar que todos los grupos presentaron valores superiores a 2,5 y similares para los grupos control y experimental, por una parte, y para los grupos normo- e hiperproteico por otra. Además, el grupo normoproteico presentó un PER similar

Tabla II

Consumo de alimento y de proteína de los cuatro grupos incluidos en la evaluación de la calidad proteica de una mezcla de proteínas con un 50% de caseinato potásico, 25% de proteínas de suero lácteo y 25% de proteína de guisante y de dos productos para NE que la contienen a diferentes concentraciones, liofilizados y adaptados a los requerimientos de las ratas durante 10 días

| Grupo | Consumo total de alimento (g) | Consumo de alimento (g/d) | Consumo de proteína (g/d) |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Control | 94,90 ± 2,10 ^{bc} | 13,56 ± 0,30 ^{bc} | 1,42 ± 0,03 |
| Proteína Experimental | 98,05 ± 1,22 ^c | 14,01 ± 0,18 ^c | 1,46 ± 0,02 |
| Dieta Normoproteica | 82,30 ± 3,49 ^a | 11,76 ± 0,50 ^a | 1,38 ± 0,06 |
| Dieta Hiperproteica | 86,70 ± 3,47 ^{ab} | 12,39 ± 0,53 ^{ab} | 1,49 ± 0,06 |

Media ± SEM. Significación $p < 0,05$ entre grupos. Los valores de cada variable que nos comparten la misma letra son significativamente diferentes.

Tabla III
Índice de Eficacia Proteica (PER), Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA), Relación Retenido/Absorbido (R/A) y Relación Retenido/Ingerido (R/I) de los cuatro grupos incluidos en la evaluación de la calidad proteica de una mezcla de proteínas con un 50% de caseinato potásico, 25% de proteínas de suero lácteo y 25% de proteína de guisante y de dos productos para NE que la contienen a diferentes concentraciones, liofilizados y adaptos a los requerimientos de las ratas durante 10 días

| Grupo | PER | CDA (%) | % R/A | % R/I |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Control | 3,88 ± 0,19 ^{bc} | 93,8 ± 0,36 ^b | 84,00 ± 1,24 ^b | 78,82 ± 1,39 ^b |
| Proteína Experimental | 4,04 ± 0,09 ^c | 93,91 ± 0,22 ^b | 85,33 ± 1,42 ^b | 80,14 ± 1,43 ^b |
| Dieta Normoproteica | 3,35 ± 0,17 ^{ab} | 90,63 ± 0,24 ^a | 76,13 ± 0,80 ^a | 68,99 ± 0,64 ^a |
| Dieta Hiperproteica | 2,85 ± 0,13 ^a | 91,22 ± 0,21 ^a | 75,21 ± 1,56 ^a | 68,63 ± 1,52 ^a |

Media ± SEM. Significación $p < 0,05$ entre grupos. Los valores de cada variable que nos comparten la misma letra son significativamente diferentes.

al del grupo control. Los CDA de la proteína experimental y de la caseína fueron similares y más elevados que los de los grupos normoproteico e hiperproteico que a su vez fueron iguales entre sí.

Para las relaciones R/A y R/I, se observaron valores similares entre los grupos experimental y control y mayores que los grupos hiperproteico y normoproteico, los cuales a la vez presentaron valores estadísticamente similares.

Discusión

El hallazgo principal de este trabajo es que la mezcla proteica constituida por 50% de caseinato potásico, 25% de suero lácteo y 25% de guisante presenta valores de PER, CDA, R/A y R/I similares a los de la proteína patrón de crecimiento, por lo que puede ser utilizada en productos de nutrición enteral.

La evolución ponderal de los animales fue en aumento progresivo en los cuatro grupos estudiados a lo largo del experimento. El grupo experimental y el control aumentaron de peso de igual manera, lo cual nos indica que la dieta que contiene la proteína experimental es adecuada y de buena calidad para mantener el crecimiento de los animales. El consumo de alimento fue mayor en el grupo experimental y control que en los de los productos normoproteico e hiperproteico liofilizados y adaptados a los requerimientos de las ratas, posiblemente debido a las características organolépticas de la dieta, ya que los grupos que fueron alimentados con estas dietas no tenían el mismo sabor y textura que los dos primeros; sin embargo, los animales no disminuyeron su velocidad de crecimiento aunque consumieron una menor cantidad de alimento.

El PER más elevado calculado por nosotros lo obtuvo la proteína experimental. Proll y cols.¹⁰ y Sarwar¹¹ han descrito en estudios similares un PER para la caseína alto, pero menor que el obtenido por nosotros para la proteína estudiada. Van Dael y cols.¹² y Silva y cols.¹³, obtuvieron un PER para la caseína menor que el observado por los autores anteriores y menor que el hallado por nosotros para el grupo con el PER más bajo

(hiperproteico). Es necesario indicar que un valor de 2,5 para el PER es el mínimo necesario considerado para las fórmulas lácteas para nutrición infantil por la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica y, por similitud, para las dietas para nutrición enteral¹⁴.

La digestibilidad del huevo, leche, carne y proteína aislada de soja es mayor de 95%¹⁵ y la de los cereales, guisantes y arroz se encuentra entre 80% y 90%¹⁵. La digestibilidad aparente de la dieta control (caseína) hallada por nosotros es de 93,8% y la de la proteína experimental es de 93,91%. Ene Bong y cols.¹⁶ observaron un CDA para la caseína de 94% y Proll y cols.¹⁰ uno de 91,2% (menor que la obtenido por nosotros para la proteína experimental) y una digestibilidad verdadera de 98,5%. Van Dael y cols.¹² y Silva y cols.¹³ han encontrado una digestibilidad verdadera para la caseína de 97% y 99,19%, respectivamente. Hallando valores de digestibilidad aparente cercanos a 94% y conociendo que al corregirla a verdadera aumenta su valor, podemos decir que la utilización digestiva de la proteína estudiada en nuestro caso, es muy buena al compararla con las proteínas de alta digestibilidad por excelencia. Las dietas normoproteica e hiperproteica obtuvieron digestibilidades menores que los dos grupos anteriores, probablemente debido a las alteraciones de la proteína por el tratamiento térmico, las cuales disminuyen la eficacia digestiva por problemas de desnaturización, dando como consecuencia una menor eficacia de las proteasas y peptidasas intestinales; sin embargo sus valores se encontraron por encima de 90%, suficiente para asegurar un suministro proteico adecuado a los pacientes alimentados con ellas a través de NE.

Tanto la R/A como la R/I obtenidas son aparentes, ya que no se ha tomado en consideración la proteína de origen endógeno. Los índices equivalentes a R/A y R/I verdaderos son el VB y la NPU.

Los valores descritos por nosotros de R/A y R/I para la proteína experimental, son mayores que los obtenidos por Van Dael y cols.¹², para el VB y la NPU de la caseína; sin embargo, los descritos por Silva y cols.¹³ y por Proll y cols.¹⁰ son más altos.

En una publicación de la FAO, de 1981¹⁷, que incluye una gran cantidad de ensayos, se menciona un VB medio para la caseína de 79,7% y una NPU media de 72,1%, valores inferiores a los hallados por nosotros para la proteína experimental y un poco mayores que los correspondientes a las dietas normo e hiperproteica. Con esto podemos afirmar que la efectividad de la proteína experimental ingerida, utilizada en el presente estudio, es elevada y adecuada para el crecimiento y desarrollo normal.

Es conveniente aclarar que las dietas control y experimental son dietas diseñadas específicamente para las ratas con todos sus componentes y con una palatabilidad aceptada por los animales. Las dietas normoproteica e hiperproteica son dietas hechas para humanos y adaptadas a los animales para cubrir sus requerimientos de nutrientes. Sin embargo, éstas han pasado por procesos tecnológicos (mezclado, tratamiento térmico y liofilización) que modifican sobre todo sus características organolépticas, por lo cual los cálculos de los índices para esos dos grupos pueden no haber alcanzado los del grupo experimental a pesar de poseer la misma fuente proteica.

Conclusión

La calidad de la mezcla proteica utilizada es excelente y adecuada para el desarrollo de productos de nutrición enteral. Asimismo, los dos productos de nutrición enteral estudiados, que incorporan esta proteína mantienen una calidad proteica adecuada tras los procesos tecnológicos realizados en su fabricación y en conjunto con los otros ingredientes de la fórmula.

Referencias

1. Martínez Augustin O, Martínez de Victoria E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr Hosp* 2006; 21(Supl. 2):1-14.
2. IOM. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). National Academy Press. 589-611, Washington, 2005.
3. Stipanuk, MH. Protein and Amino Acid Requirements. En: Stipanuk MH editor. *Biochemical, Physiological, Molecular Aspects of Human Nutrition*. Saunders Elsevier. 419-448, Missouri, 2006.
4. Pérez F, Larqué E, Zamora S. Capítulo 2.18: Calidad Nutritiva de los Alimentos. En: Gil A, editor. *Tratado de Nutrición*. Tomo II. Grupo Acción Médica. 619-645, Madrid, 2004.
5. Schaafsma G. The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS)-A concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. *J AOAC* 2005; 88(3):988-994.
6. Losch H, Allison SP, Meier R y cols. Introductory to the ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Terminology, Definitions and General Topics. *Clin Nutr* 2006; 25:180-186.
7. Álvarez Hernández J, Peláez Torres N, Muñoz Jiménez A. Utilización clínica de la nutrición enteral. *Nutr Hosp* 2006; 21(Supl. 2):87-99.
8. Mitchell HH. A method of determining the biological value of protein. *J Biol Chem* 1923; 873-907.
9. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.
10. Proll J, Petzke KJ, Ezeagu IE, Metges CC. Low nutritional quality of unconventional tropical crop seeds in rats. *J Nutr* 1998; 128:2014-2022.
11. Sarwar G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of protein containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acid in rats. *J Nutr* 1997; 127:758-764.
12. Van Dael P, Kastenmayer P, Clough J, Jarret AR y cols. Substitution of casein by [beta]-casein or of whey protein isolate by [alpha]-lactalbumin does not affect mineral balance in growing rats. *J Nutr* 2005; 135(6):1438-1443.
13. Silva W, Arbaiza T, Carcelén F, Lucas O. Evaluación biológica en ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*) de fuentes proteicas usadas en alimentos comerciales para perros. *Rev Inv Vet Perú* 2003; 14:18-23.
14. ESPGAN. Committee on Nutrition. Guidelines on infant nutrition. I. Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1977; 262:1-20.
15. Millward DJ, Jackson AA. Protein/energy ratios of current diets in developed and developing countries compared with a safe protein/energy ratio: implication for recommended protein and amino acid intake. *J Pub Health Nutr* 2003; 7(3):387-405.
16. Ene Bong HN, Obizoba IC. Protein quality of some Nigerian traditional diets based on the African yambean (*Sphenostylis stenocarpa*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Plant Food Hum Nutr* 1995; 48:297-309.
17. FAO. Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. 1981. Acceso el 12 de diciembre de 2007. Internet: <http://www.fao.org/DOCREP/005/AC854T/AC854T77.htm>.