Recursos Proteínicos

en América Latina

Editores:

Moisés Béhar y Ricardo Bressani

Memorias de una Conferencia de nivel latinoamericano celebrada en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), ciudad de Guatemala, del 24 al 27 de febrero de 1970

EVALUACION BIOLOGICA DE LAS PROTEINAS

Dr. Ricardo Bressani
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
Guatemala, C. A.

Función primaria de la proteína en la dieta es suministrar al organismo una mezcla de aminoácidos cuyo balance sea apropiado para la síntesis y el mantenimiento de las proteínas de los tejidos. La adecuación relativa de una proteína en cuanto a suplir el patrón de aminoácidos requerido a un organismo dado, es el factor determinante de la magnitud de las respuestas biológicas que se observan. Por consiguiente, desde el punto de vista práctico, todos los métodos usados para valorar la calidad nutricional de las proteínas están directa o indirectamente relacionados con la evaluación de la eficiencia relativa de las diferentes proteínas en lo que a satisfacer los requerimientos de los aminoácidos esenciales se refiere.

En general, casi todos los métodos que comúnmente se emplean en el desarrollo de estudios del valor nutritivo de las proteínas, evalúan las respuestas biológicas obtenidas bajo condiciones experimentales controladas. Existen varias respuestas que utilizadas por sí solas o en combinación con otras, permiten valorar las proteínas. La eficiencia y utilidad de cualquier método que en particular se utilice depende muy críticamente del éxito que se tenga en asegurar que bajo las condiciones experimentales usadas, la proteína de la dieta sea el único factor limitante de la respuesta seleccionada para estudio.

Es importante señalar que el valor biológico de una proteína y el valor nutritivo de la proteína en la dieta no deben confundirse. El primer concepto tiene como objetivo evaluar única y exclusivamente la cantidad de aminoácidos esenciales disponibles al organismo animal para satisfacer sus respectivos requerimientos durante la situación fisiológica en que se encuentra. En cambio, el segundo concepto se refiere a la aplicación de los resultados del primero, y su propósito es evaluar la capacidad de la proteína, juntamente con otros nutrientes, en inducir estados nutricionales adecuados.

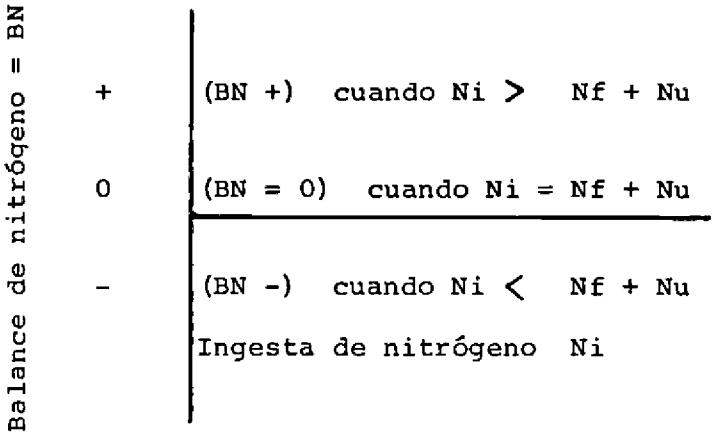
El objetivo de este trabajo es exponer, en forma resumida, varios métodos que corrientemente se utilizan para evaluar el valor nutritivo de la proteína; comentar los factores que afectan los resultados, y dar a conocer ecuaciones que relacionan unos métodos con los otros. Finalmente, valiéndose de ciertos resultados, se persigue subrayar que el valor nutritivo de una proteína es el mismo o muy similar para diferentes especies de animales, así como para el hombre.

Balance Nitrogenado

El principio en que se basan los estudios de balance en nutrición, no difiere del principio de balance que rige en

otras ciencias, ya que mide las ganancias netas o pérdidas que ocurren en la utilización de las sustancias requeridas por el organismo. El organismo ingiere nitrógeno con los alimentos y lo elimina constantemente; por consiguiente, la determinación de nitrógeno en el alimento y en las excreciones proporciona una medida cuantitativa del metabolismo proteínico. Además, indica si el organismo está perdiendo o ganando proteína en las condiciones que existen en el momento en que se efectúan las mediciones.

Como lo muestra la Gráfica 1, el balance de nitrógeno puede definirse como la cantidad del nitrógeno ingerido que es retenido en el cuerpo. En la fórmula, BN equivale a balance nitrogenado, Ni, a nitrógeno ingerido, Nf, a nitrógeno fecal, y Nu, a nitrógeno urinario.



GRAFICA 1

Representación esquemática del balance nitrogenado ($BN = Ni - (Nf + Nu)$).

El nitrógeno aparentemente absorbido es igual a la diferencia entre la ingesta de nitrógeno y el nitrógeno fecal. Según esta fórmula, el balance nitrogenado es positivo cuando la ingesta de dicho elemento es mayor que la suma del nitrógeno excretado en la orina y en las heces, y en este caso ocurre una ganancia corporal neta de N. Todos los animales en crecimiento bajo condiciones normales están en balance nitrogenado positivo. Si el N ingerido es igual a la suma del N excretado en las heces y en la orina, el balance de nitrógeno es igual a cero, en cuyo caso el individuo está en equilibrio nitrogenado. Los animales adultos en condiciones normales se encuentran en equilibrio. Por el contrario, si la suma del N en las heces y en la orina es mayor que el N ingerido, el balance de nitrógeno es negativo, y el individuo está en balance nitrogenado negativo.

Según Allison (1) el balance de nitrógeno es la suma de las ganancias y pérdidas de todas las proteínas tisulares del cuerpo; en consecuencia, puede usarse como una medida de la calidad proteínica para el animal bajo estudio.

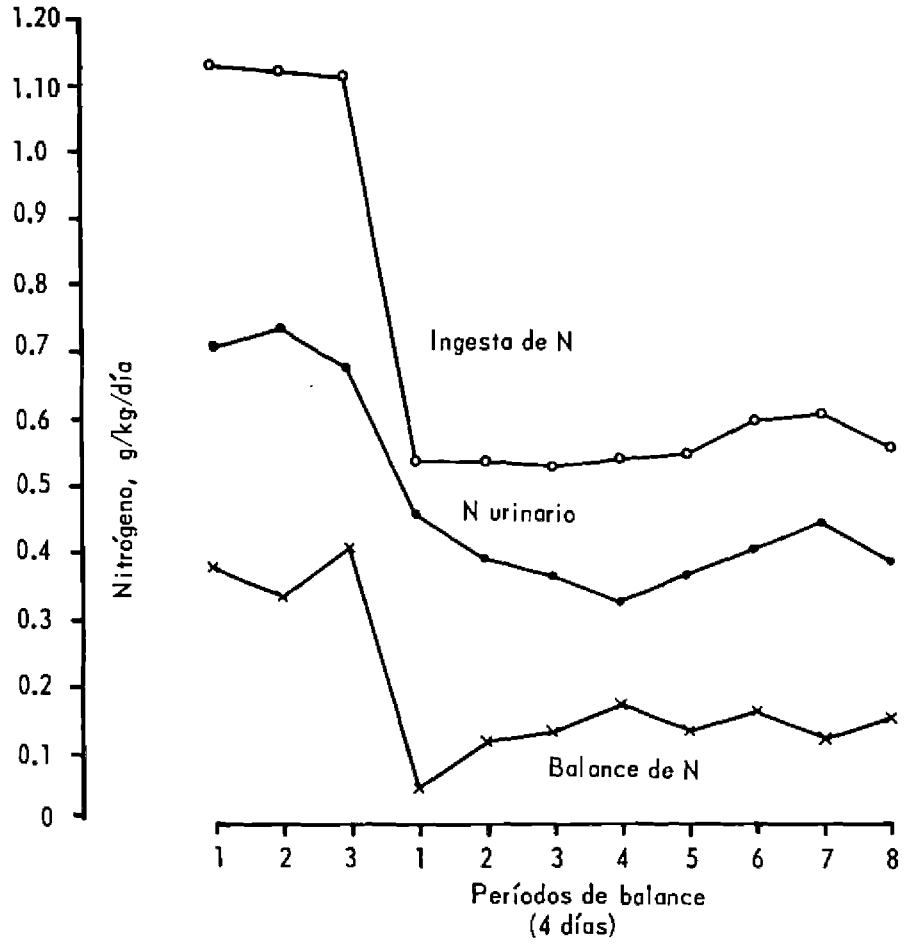
Sin embargo, es posible que haya balance de nitrógeno positivo aun cuando simultáneamente ocurra una pérdida de N en algún tejido. Por ejemplo, Allison (1) logró demostrar que bajo condiciones de *stress* y no obstante que ciertos tejidos pueden mantenerse a expensas de otros, todavía es posible alcanzar un balance final positivo. De la misma manera, el mantenimiento del equilibrio nitrogenado no significa que todos los tejidos se están manteniendo así, ni el hecho de que la provisión de nitrógeno sea suficiente para mantener equilibrio nitrogenado en el adulto, necesariamente implica que se están satisfaciendo los requerimientos de nitrógeno. El equilibrio nitrogenado puede ajustarse a distintos niveles a través de una adaptación metabólica, de tal manera que es posible mantener a un individuo en estado de depleción proteínica y con equilibrio nitrogenado.

A pesar de que para propósitos prácticos el balance nitrogenado es igual a la ingesta de N menos la suma del N en las heces y en la orina, ciertos resultados obtenidos recientemente indican que la fórmula original BN = Ni - (Nf + Nu), no es del todo correcta. Varios investigadores (2, 3) han demostrado que además de las pérdidas de N fecal y urinario, que representan la mayor parte del nitrógeno perdido, existen otras pérdidas de ese elemento que, en situaciones especiales, pueden tener significancia práctica. Por ejemplo, en humanos se ha demostrado que cantidades significativas de nitrógeno son eliminadas por el sudor (3, 4). En estudios de larga duración, las pérdidas por la piel y el cabello pueden ser también significativas. Se ha encontrado, asimismo, que el perro elimina nitrógeno durante la respiración (5). En vista de tales hallazgos, se considera que una mejor forma de estimar el balance nitrogenado sería tomando en cuenta estas pérdidas, que podrían llamarse pérdidas de nitrógeno insensible o Ns, en otras palabras, modificando la fórmula original como sigue: BN = Nf + Nu + Ns. Esta modificación, sin embargo, sólo es necesaria en la estimación de los requerimientos de nitrógeno y en los cálculos de balance nitrogenado. No se requiere para establecer medidas comparativas de balance nitrogenado entre varios tratamientos proteínicos, de corta duración, y bajo condiciones experimentales controladas, en cuyo caso se obtiene un balance de nitrógeno aparente.

Factores que Afectan el Balance Nitrogenado

Son varios los factores que afectan el balance de nitrógeno. La Gráfica 2 muestra el efecto que la disminución de la ingesta de nitrógeno tiene sobre el balance nitrogenado (6). Al reducir ésta de más o menos 1.1 g/kg/día a 0.5 g/kg/día, el balance de nitrógeno disminuyó de 0.38 a 0.055 g/kg/día. En cambio, al mantener constante la ingesta de N, el balance de nitrógeno aumentó ligeramente durante los tres períodos siguientes y luego permaneció menos variable en los cinco períodos adicionales que incluyó el estudio. El incremento en balance de nitrógeno que ocurre después de disminuir la ingesta demuestra la capacidad que el organismo tiene para adaptarse a una menor ingestión.

La misma Gráfica muestra también que al reducir la ingesta de nitrógeno (Ni) el nitrógeno urinario disminuye; esa



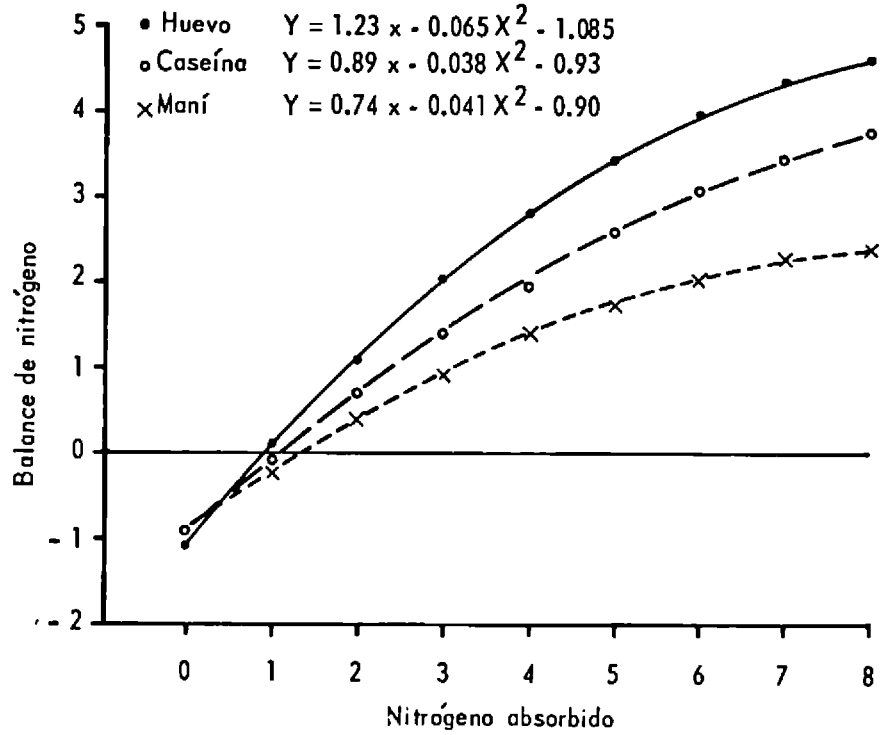
Tomada de: Bressani, R., *et al.* (6).

GRAFICA 2

Relación entre la ingesta de nitrógeno y el balance nitrogenado, en perros (utilizando caseína).

disminución que al principio es apreciable, va reduciéndose progresivamente conforme el organismo se adapta a la menor ingesta (6). Ello indica que cuando se usa este método es necesario llegar a obtener un estado de excreción urinaria de nitrógeno constante.

Los resultados de estudios de Forbes, Vaugham y Young (7) que se presentan en la Gráfica 3 muestran el efecto de varios niveles de ingesta de N sobre el balance nitrogenado en ratas jóvenes. Según se observa, la digestibilidad permanece constante para cada proteína, y por esta razón, el nitrógeno absorbido puede relacionarse gráficamente con el balance nitrogenado. La respuesta es curvilínea, y la regresión para cada fuente de proteína es altamente significativa. Los datos demuestran también que a medida que el nitrógeno absorbido aumenta, el balance nitrogenado acusa cierto incremento, pero a una tasa decreciente. A niveles bajos de ingesta de nitrógeno se nota una respuesta de menor curvatura para la proteína de huevo que para la caseína o para la proteína del maní.



Tomada de: Forbes, R. M., L. Vaughn, y M. Yohe (7).

GRAFICA 3

Relación entre el balance de nitrógeno y el nitrógeno absorbido, en ratas jóvenes.

Esto puede atribuirse posiblemente al hecho de que para las necesidades de la rata en crecimiento, el balance de aminoácidos en la proteína del huevo es mejor que el de las otras proteínas. La tasa decreciente que acusa el incremento en balance nitrogenado a medida que aumenta el nitrógeno absorbido de una proteína incompleta, puede explicarse en base a la dilución de los aminoácidos disponibles de origen endógeno que ocasionan los aminoácidos absorbidos de la proteína deficiente. De esta forma, el balance de la mezcla total de aminoácidos disponible a los tejidos es, en realidad, de menor eficiencia para la síntesis proteínica.

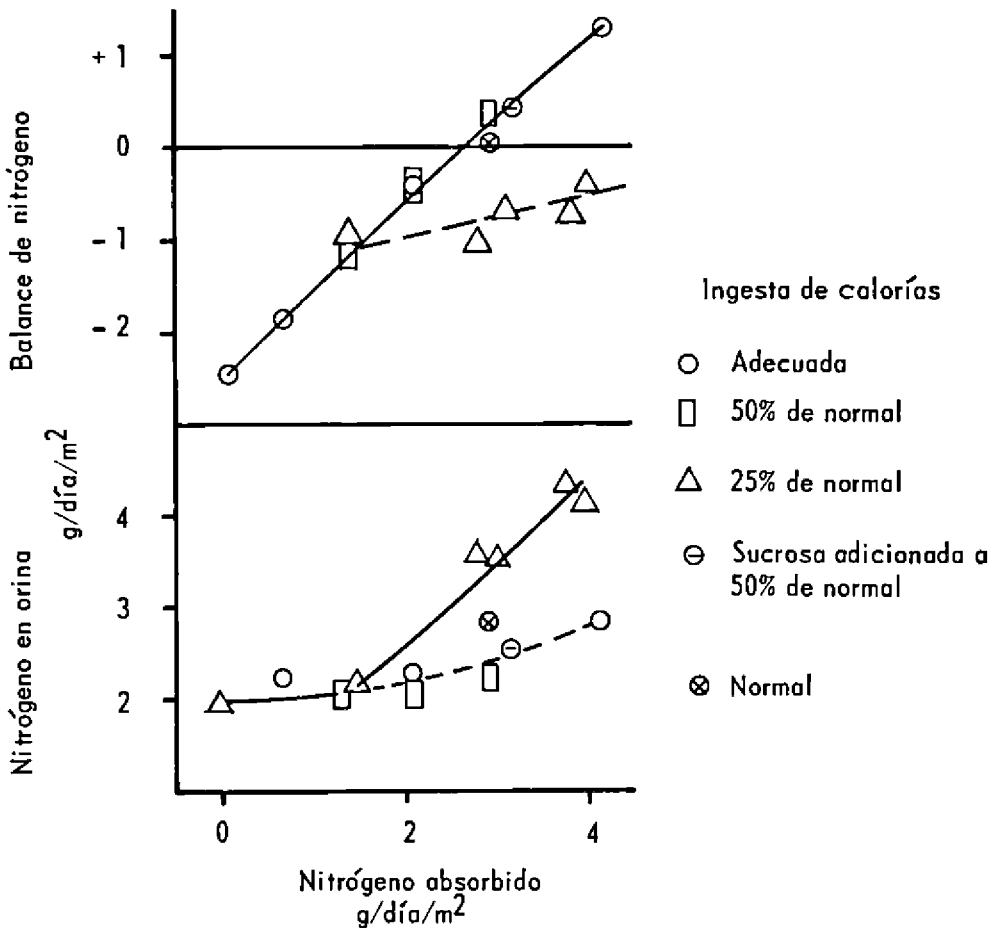
El efecto de la ingesta de calorías sobre el balance de nitrógeno en perros adultos estudiados por Allison (8) lo ilustra la Gráfica 4. Uno de los tres grupos experimentales (control) recibió la proteína, en este caso albúmina de huevo, con una ingesta calórica adecuada; al segundo se le suministró una ingesta de calorías equivalente al 50% de la del primer grupo, y al tercero solo se le ofreció el 25% de la ingesta calórica del grupo testigo. Con la ingesta de calorías más baja los perros no demostraron estar en balance positivo, aun cuando su ingestión de nitrógeno era hasta de 4 g/día/m^2 de superficie corporal. La excreción de nitrógeno en la orina fue mayor cuando las calorías eran limitantes. Según demuestran estos datos, la utilización de la proteína está relacionada con la presencia, en la dieta, de una proporción crítica de calorías.

El efecto de cambios en la ingesta de agua sobre el balance de nitrógeno se muestra en el Cuadro No. 1. Los resultados de estos estudios, realizados por Bressani y Braham (9) también en perros, demuestran que independientemente de la ingesta proteínica, la administración de niveles bajos de ingesta de agua resulta en excreciones reducidas de nitrógeno en la orina; por consiguiente, se obtienen valores altos de retención de nitrógeno. Por el contrario, con ingestas altas de agua las excreciones de nitrógeno en la orina son elevadas, siendo el resultado menores retenciones de nitrógeno.

Bien puede ser que el exceso de agua tenga un efecto de lavado del nitrógeno resultante del catabolismo proteínico, ya que se encontró que con ingestas altas de agua la mayor parte del nitrógeno en la orina era amoníaco en vez de urea.

En todo caso, los resultados indican que al usar el balance de nitrógeno como método de evaluación proteínica, la ingesta de agua debe permanecer constante.

Otro factor que afecta el balance nitrogenado es la condición llamada imbalance de aminoácidos. A pesar de que



Tomada de: Allison, J. B. (8).

GRAFICA 4

Efecto de diferentes niveles de ingesta calórica sobre el balance de nitrógeno, en perros (utilizando albúmina de huevo).

CUADRO 1

Efecto de cambios en la ingesta de agua sobre el balance de nitrógeno en perros

Ingesta de agua ml/día	Nitrógeno			
	Ingesta	Fecal	Urinario	Balance
		mg/kg/día		
400	692	41	374	277
1000	701	57	517	127
400	703	51	443	204
1000	665	28	450	187
400	668	36	388	244
1000	673	42	464	167

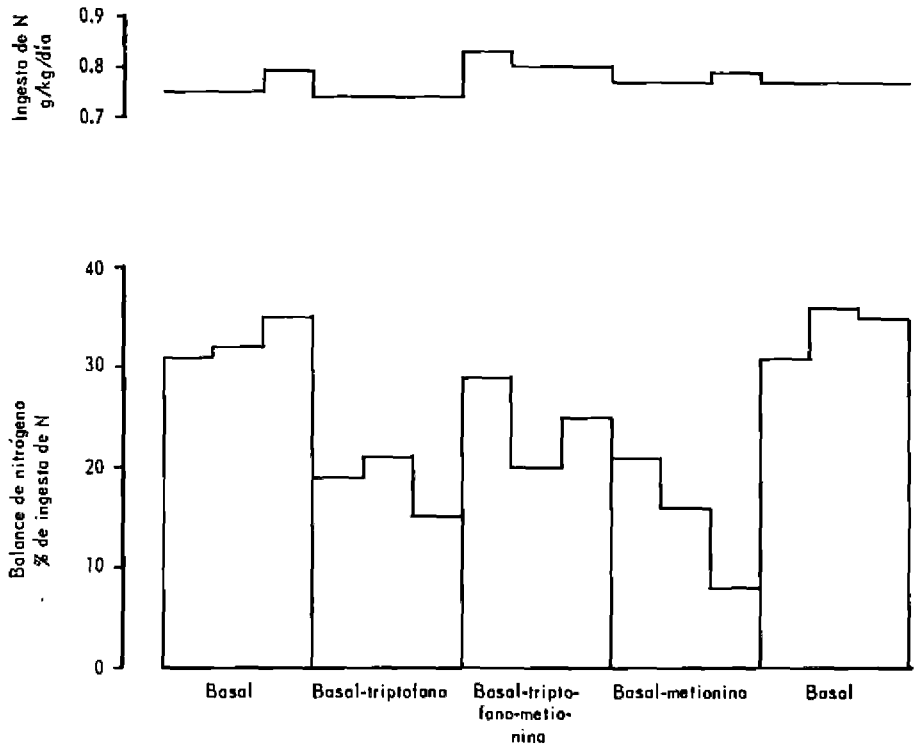
Tomado de: Bressani, R., y J. E. Braham (9).

dicho imbalance es una situación inducida por la adición de aminoácidos no limitantes en la proteína (10), se puede considerar como un factor que afecta el balance de nitrógeno. Ello es de importancia cuando se usa este método para estudiar las posibilidades de mejoramiento de calidad proteínica mediante la suplementación con aminoácidos. En la Gráfica 5 se presenta un ejemplo del imbalance resultante de la administración de mezclas de gelatina y caseína (11). El efecto del imbalance se corroboró en los tratamientos aplicados entre dos períodos en que los animales fueron alimentados con la dieta basal, ya que ese imbalance causó una reducción significativa en el equilibrio nitrogenado. Asimismo, al ofrecer la dieta con imbalance de aminoácidos se constató una gran variación en la retención de nitrógeno, que desapareció al corregir el imbalance. Al mismo tiempo ocurrió un aumento significativo en la retención nitrogenada. En los estudios de Kumta, Harper y Elvehjem (12), también en ratas, dichos investigadores obtuvieron resultados similares.

El método de balance nitrogenado puede ser muy útil para clasificar las proteínas según su contenido de aminoácidos esenciales (1), y para detectar estados de depleción proteínica (8, 13), así como otras condiciones. Sin embargo, en muchos casos carece de la sensibilidad deseada, dado que representa el final de un proceso metabólico. Por otro lado, y debido a la necesidad de mantener a los animales en jaulas metabólicas, con poca actividad, esto se traduce en algunos cambios en composición corporal. Por ejemplo, se ha indicado (14) que los cerdos enjaulados metabólicamente crecen con mayor lentitud y tienen más grasa que cerdos de la misma edad y sujetos a la misma dieta, pero que gozan de libertad.

Valor Biológico

Thomas, en 1909 (15) propuso un método fundamental y menos variable para determinar el valor nutritivo de la proteína



Dieta basal: Gelatina + caseína + triptofano + metionina.
Tomada de: Bressani, R. (11).

GRAFICA 5

Efecto del desbalance de aminoácidos sobre la retención de nitrogeno, en perros .

dietética, en cuya aplicación se utiliza la información derivada de los estudios de balance nitrogenado. Dicho investigador definió el valor biológico como el porcentaje del nitrógeno absorbido que es retenido en el organismo; este valor puede expresarse matemáticamente según se indica en el Cuadro No. 2. El método fue estudiado extensamente, modificado y aplicado al estudio del valor biológico de muchas proteínas, por Mitchell (16-18). Su utilización permite obtener, además del valor biológico de la proteína bajo estudio, su verdadera digestibilidad, la cual se define como el porcentaje de la ingesta de nitrógeno que se absorbe. En la determinación del valor biológico se debe tomar en cuenta la contribución del nitrógeno endógeno fecal y urinario al nitrógeno total de las heces y de la orina. Por consiguiente, en la ecuación del Cuadro No. 2, Ni equivale a la ingesta de nitrógeno, Nf al nitrógeno fecal, Nm al nitrógeno fecal metabólico, Nu al nitrógeno en la orina y Ne al nitrógeno endógeno urinario. En teoría, todas las cantidades en la ecuación deben medirse al mismo tiempo y en cada estudio. No obstante, esto no es posible en la práctica, y las fracciones endógenas del metabolismo del nitrógeno se miden en pruebas separadas en las cuales los animales de experimentación son alimentados con dietas libres de nitrógeno. En todo caso, tanto la ingesta de calorías como la de otros nutrientes debe permanecer constante durante los períodos en los cuales se usa la dieta sin nitrógeno, al igual que en aquéllos en que se utiliza la

proteína bajo estudio. La ingesta de nitrógeno debe ser baja, pero suficiente para permitir el crecimiento del animal utilizado en el estudio, si éste es joven, y su equilibrio nitrogenado, si se trata de un animal adulto.

CUADRO 2

Valor biológico. Cantidad de nitrógeno absorbido que es retenido por el organismo

$$VB = \frac{Ni - (Nf = Nm) - (Nu - Ne)}{Ni - (Nf - Nm)} \times 100$$

Ni = Nitrógeno ingerido

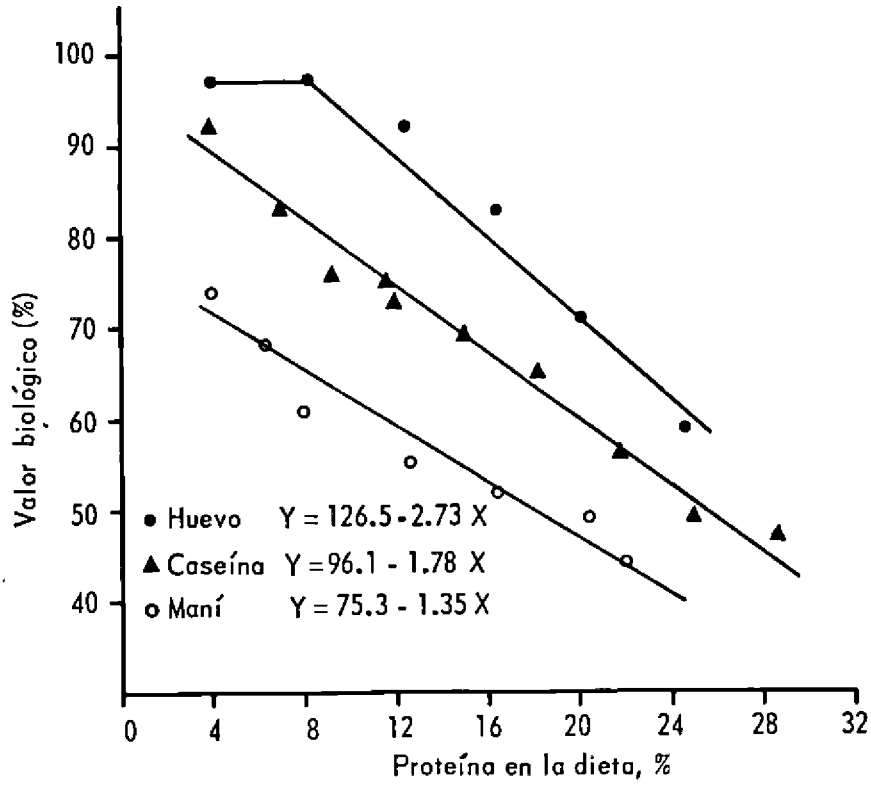
Nf = Nitrógeno fecal

Nm = Nitrógeno fecal metabólico

Nu = Nitrógeno urinario

Ne = Nitrógeno endógeno urinario

Varios investigadores han estudiado los factores que afectan los valores obtenidos con el método de valor biológico. Uno de estos factores es la concentración proteínica en la dieta o la ingesta de proteína (7, 12). En la Gráfica 6 se presenta el valor biológico de tres proteínas (huevo, caseína y maní) administradas a diversas concentraciones en la dieta, a ratas en crecimiento. La Gráfica también muestra las ecuaciones de regresión de cada proteína. Según se observa, el análisis estadístico de las líneas de regresión indicó que eran significativamente diferentes entre sí. Por consiguiente, el valor biológico de dichas proteínas depende de su concentración en la dieta, en tanto que las relaciones cuantitativas entre ellas dependen del nivel al que se hace la comparación. Henry y Kon (19) estudiaron otros aspectos relativos al nivel proteínico sobre el valor biológico. En el Cuadro No. 3 se da a conocer el efecto del nivel de ingesta proteínica y de la deficiencia de aminoácidos en la proteína, sobre el valor biológico de la misma, determinado en ratas jóvenes. Los resultados indican que cualquier descenso en el valor biológico, al cambiar la ingesta proteínica de 4 a 8%, puede ser función de la proteína bajo estudio. De esta forma, para una proteína como la del huevo, o para otra deficiente sobre todo en metionina, la caseína, por ejemplo, el valor biológico no difiere significativamente. Sin embargo, cuando la deficiencia principal es la lisina, el valor biológico es mucho mayor al nivel más bajo, o sea al usarse una ingesta proteínica de 4%. La lisina es esencial para el crecimiento de la rata joven, pero lo es menos para la rata adulta. Por consiguiente, si la rata joven no crece, su requerimiento de lisina corresponderá en un grado más cercano al requerimiento de la rata adulta, y el valor biológico alto que se obtenga, será indicativo de que no existe deficiencia de lisina. En otras palabras, si ciertas proteínas son estudiadas a niveles muy bajos en ratas jóvenes,



Tomada de: Forbes, R. M., L. Vaughn, y M. Yohe (7).

GRAFICA 6

Relación entre el valor biológico y concentración proteínica en la dieta.

CUADRO 3

Efecto del nivel de ingesta proteínica y de la deficiencia de aminoácidos sobre el valor biológico, en ratas jóvenes

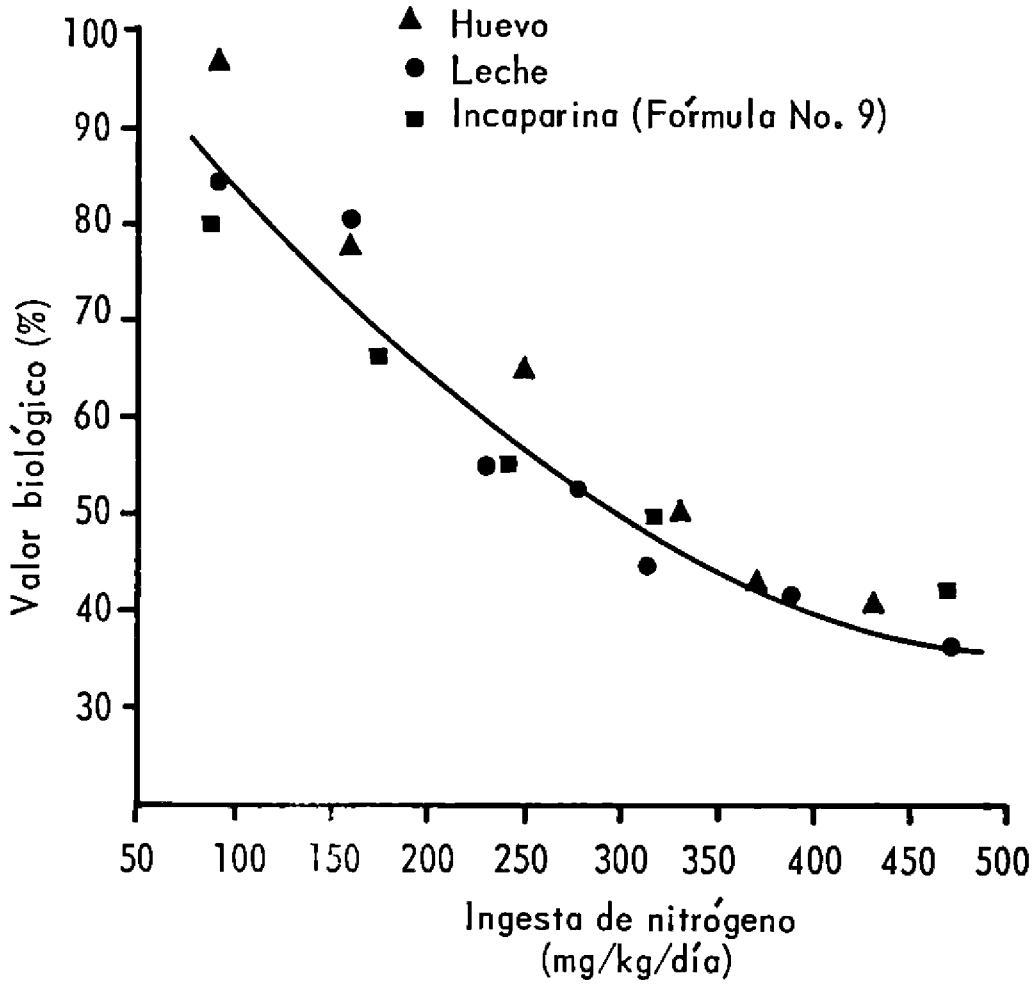
Proteína	Nivel %	VB	Aminoácido limitante
Huevo	4	93	Ninguno
	8	94	Ninguno
Caseína	4	77	Metionina
	8	73	Metionina
Caseína + 0.4% de metionina	4	81	?
	8	81	?
Leche descremada almacenada	4	71	Lisina y
	8	59	metionina
Leche descremada almacenada + 1.25% de lisina	4	89	Metionina
	8	86	Metionina

Tomado de: Henry, K. M., y S. K. Kon (19).

bien puede ser que no se detecten deficiencias de aminoácidos - que son evidentes a niveles ligeramente mayores - obteniéndose un valor biológico alto. Este es el motivo por el cual cuando se realizan pruebas de valor biológico en animales jóvenes, usando este método, es más satisfactorio el empleo de niveles de proteína que permitan un crecimiento razonable.

Como lo muestra la Gráfica 7, en los niños los efectos del nivel proteínico también siguen las mismas tendencias que en las ratas jóvenes. En este caso, las pruebas de valor biológico se hicieron con varias mezclas vegetales desa-. rrolladas por el INCAP (20). Estos resultados demuestran que la relación entre la ingesta de proteína y su valor biológico es igual tanto para las diferentes especies de animales, como para el hombre (7, 19, 20).

Un segundo factor que afecta el valor biológico de una proteína es la edad del animal experimental (Cuadro No. 4).



Datos de: Bressani, R., *et al.* (20).

GRAFICA 7

Relación entre el valor biológico y la ingesta de nitrógeno, en niños.

Este estudio (19) se llevó a cabo en ratas jóvenes alimentadas con el nivel bajo de proteína, con y sin suplementación de aminoácidos, obteniéndose un valor biológico más bajo que en ratas adultas que recibieron el mismo nivel de proteína en la dieta. En las ratas jóvenes no se observaron cambios en cuanto a valor biológico a medida que el nivel proteínico en la dieta ascendía de 4 a 8%, excepto cuando se usó leche, mientras que en las ratas adultas, el valor biológico disminuyó.

CUADRO 4

Efecto del nivel de la ingesta proteínica y de la edad sobre el valor biológico, en ratas

Nivel de proteína	Edad	Valor biológico		Leche
		Caseína	Caseína + 0.4% DL-metionina	
4	Joven	76.5	80.5	84.5
	Adulta	84.6	87.7	94.8
8	Joven	72.7	81.1	64.8
	Adulta	60.5	65.2	76.6

Tomado de: Henry, K. M., y S. K. Kon (19).

Otro factor que afecta el valor biológico de las proteínas es la ingesta calórica. En el Cuadro 5 se presentan los resultados de un experimento realizado por Forbes y Yohe (21) en el que la ingestión de alimentos fue regulada a 4, 6 y 8 g/día. Se estudiaron dos proteínas (fibrina y soya) y para ambas el aumento en ingesta de 4 a 8 g diarios indujo un aumento en valor biológico. Es probable que los animales que consumían el nivel bajo de calorías hayan utilizado la mayor parte de la proteína absorbida para suplir sus necesidades de mantenimiento energético y, por consiguiente, no lo usaron para la síntesis de proteína. Esto explicaría el valor biológico bajo que se obtiene con la administración de un nivel calórico inferior, ya que el nitrógeno de la proteína, utilizado como fuente de energía, aparece en la orina como nitrógeno perdido.

Existen otros factores que también pueden interferir con la determinación del valor biológico de las proteínas. Entre éstos tal vez el más importante es el estado de depleción proteínica del organismo animal: cuanto más depletado esté, más alto será el valor que se obtenga. En consecuencia, cuando se compara o determina el valor biológico de varias proteínas, es absolutamente imprescindible estandarizar el método en la mayor medida posible.

CUADRO 5

Valor biológico de harina de torta de soya y de fibrina en ratas alimentadas con diferentes niveles de energía

Ingesta de alimento g/día	Valor biológico	
	Harina de soya %	Fibrina + metionina
4.0	56.7 ± 2.57*	68.7 ± 3.70
6.0	68.6 ± 2.78	94.9 ± 2.88
8.0	70.0 ± 2.25	98.5 ± 1.00
	Fibrina + metionina	Harina de soya
4.0	79.8 ± 8.05	61.4 ± 3.90
6.0	97.7 ± 1.00	70.5 ± 2.95
8.0	96.2 ± 1.33	74.9 ± 2.15

* Promedio ± Error Estándar.
Tomado de: Forbes, R. M., y M. Yohe (22).

Indice de Balance Nitrogenado

Allison (1) demostró que usando perros adultos como animales de experimentación y bajo condiciones apropiadas, era posible relacionar el nitrógeno absorbido (Na) con el balance nitrogenado (BN), obteniéndose una línea recta. La relación entre el N absorbido y el N retenido es linear en la región de balance nitrogenado negativo, y esta linearidad se extiende un tanto del lado positivo para luego transformarse en claramente curvilínea en la región de balance nitrogenado altamente positivo. La ecuación empírica de la región linear de la relación entre Na y BN figura en el Cuadro 6. En la ecuación No. 1, BN equivale a balance de nitrógeno, Na = nitrógeno absorbido, Ne_0= la suma de las excreciones fecales y de la orina del N obtenido de los animales alimentados con dietas sin proteína, y K es la tangente de la línea o la tasa de cambio del balance nitrogenado con respecto al N absorbido, relación que equivale a una medida de valor biológico (índice de balance nitrogenado).

Por definición, el valor biológico es igual al nitrógeno absorbido (Na) menos la diferencia entre el nitrógeno urinario (Nu) y el nitrógeno endógeno urinario (Ne), todo esto sobre el nitrógeno absorbido (ecuación No. 1). Asimismo, por definición el nitrógeno absorbido (Na) es igual al nitrógeno ingerido (Ni) menos la diferencia entre el nitrógeno fecal (Nf) y el nitrógeno fecal metabólico (Nm) (ecuación No. 3). La sustitución del Na del numerador de la ecuación No. 2 por el Na de la ecuación No. 3 da origen a la ecuación No. 4. Por definición, el balance de nitrógeno (BN) es igual al Ni menos Nf menos Nu (ecuación No. 5). Al sustituir el Ni de la ecuación No. 5 por el Ni de la ecuación No. 4 se obtiene la ecuación No. 6. Asumiendo que la excreción total de nitrógeno obtenida de una dieta libre de nitrógeno (Ne_0) es igual al nitrógeno endógeno urinario más el nitrógeno metabólico fecal

(ecuación No. 7) y sustituyendo estos valores por los de la ecuación No. 6 se obtiene la ecuación No. 8 y la ecuación No. 9. Estas significan que el balance de nitrógeno (BN) es igual al valor biológico (VB) multiplicado por el nitrógeno absorbido menos el nitrógeno endógeno total. Si se compara las ecuaciones 1 y 9 se observa que son iguales, pudiéndose asumir, por lo tanto, que el valor biológico es igual a la constante K cuando el nitrógeno endógeno excretado es constante. Allison (1) identificó la constante K como el índice de balance nitrogenado.

CUADRO 6

Indice de balance nitrogenado

1.	BN	=	$K\ (Na) - Ne_0$
2.	VB	=	$\frac{Na - (Nu - Ne)}{Na}$
3.	Na	=	Ni - (Nf - Nm)
4.	(VB) (Na)	=	Ni - Nf - Nu + Ne + Nm
5.	BN	=	Ni - Nf - Nu
6.	(VB) (Na)	=	BN + Ne + Nm
7.	Ne_0	=	Ne + Nm
8.	(VB) (Na)	=	BN + Ne_0
9.	BN	=	(VB) (Na) - Ne_0

De (1) y (9) se infiere que:

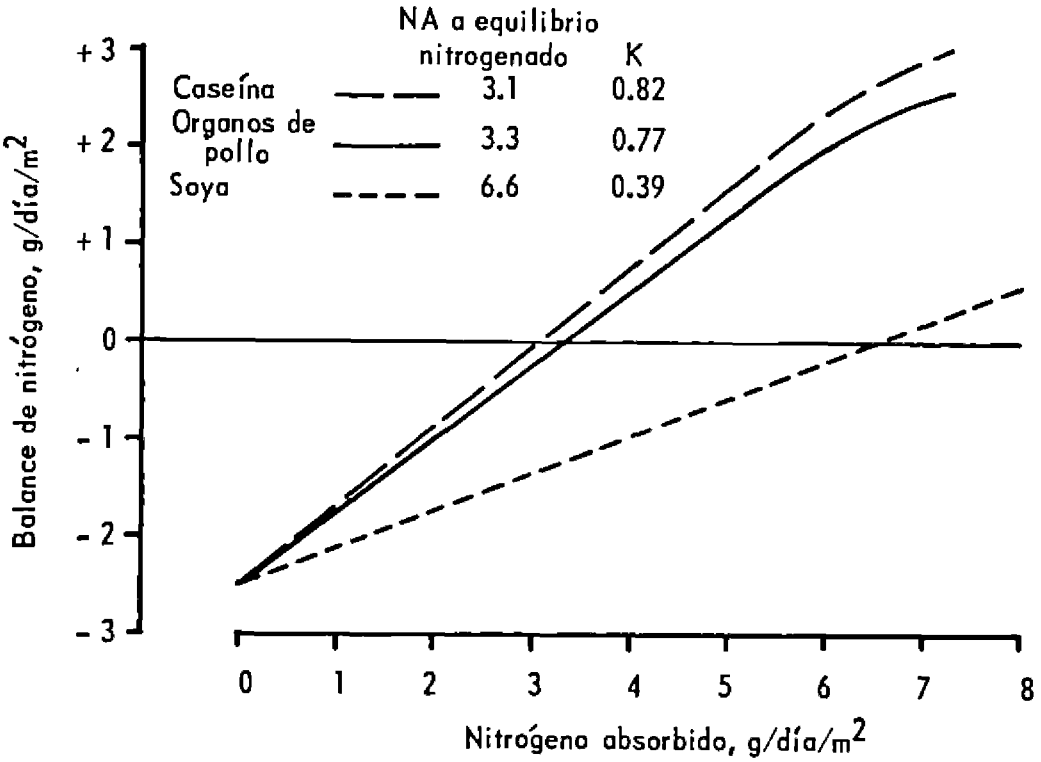
VB = K

Ne_0 = Suma de excreciones fecales y de la orina de N.
Ne = N endógeno urinario.
Nu = N urinario.
Nf = N fecal.
Nm = N metabólico fecal.

La ecuación descrita ha sido aplicada a diferentes especies de animales y también al hombre. La Gráfica 8 ilustra algunos de los resultados obtenidos por Allison y Anderson (22) en perros adultos, utilizando caseína, órganos de pollo y proteína de soya. La misma Gráfica muestra la relación linear entre el N absorbido y el balance nitrogenado en la región de balance de nitrógeno negativo. La relación de N absorbido a equilibrio nitrogenado es de 3.1, 3.3 y 6.6 g de $N/kg/m^2$ de área de superficie corporal, y los índices de valor biológico, 0.82, 0.77 y 0.39, respectivamente.

Hoffman y McNeil (23) han usado este método con sujetos humanos adultos, y los datos derivados de tales estudios se muestran en la Gráfica 9. Según se aprecia, en la región de balance nitrogenado negativo, la relación entre el N absorbido

y el balance nitrogenado es de carácter linear, pero las ingestas de nitrógeno por arriba de 100 mg/kg/día, dan respuesta con curvatura. El índice de balance nitrogenado para el gluten de trigo es de 0.53, y para el gluten suplementado con lisina, de 0.67. El requerimiento de nitrógeno necesario para alcanzar equilibrio es de 81 y 64 mg/kg/día respectivamente.



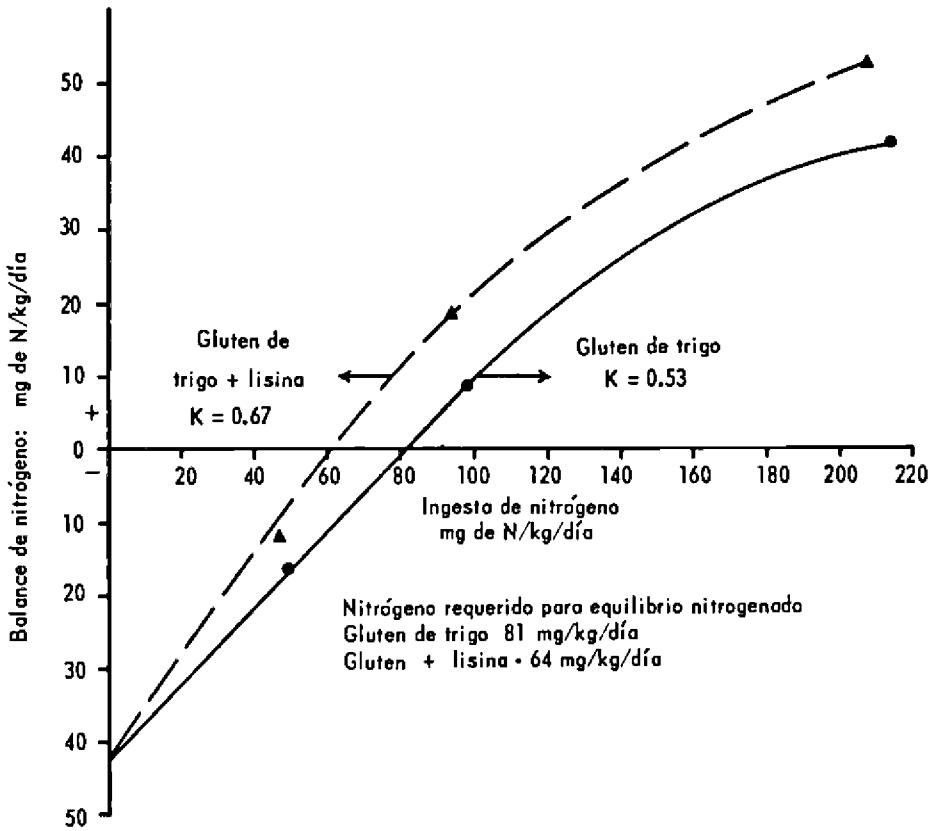
Tomada de: Allison, J. B., y J. A. Anderson (23).

GRAFICA 8

Indice de balance nitrogenado en perros adultos.

Tal como lo indica la Gráfica 10, el método también ha sido aplicado a niños en el INCAP (20). En este caso, la relación entre el Na y el BN es linear en la región negativa de balance nitrogenado, por lo que a partir de este hallazgo se pueden hacer los mismos cálculos que con los adultos; sin embargo, es de interés observar que no se obtiene una curva al aumentar la ingesta aún a niveles relativamente altos. Es muy probable que esto sea debido a que los organismos jóvenes están cambiando y sintetizando proteína constantemente, lo que hace que la relación no llegue a una curvalinearidad a menos que las ingestas sean más altas.

El problema más serio que se enfrenta al usar este método se relaciona con la estimación del N endógeno excretado, tanto en adultos como en niños. Ello se debe a la necesidad de usar dietas libres de nitrógeno que pueden ser dañinas si el tiempo de experimentación se prolonga. Sin embargo, esto no es necesario, ya que con solo obtener valores por debajo y ligeramente por encima de equilibrio nitrogenado, se puede calcular el índice de balance de nitrógeno. Ya que este



Tomado de: Hoffman, W. S., y G. C. McNeil (24).

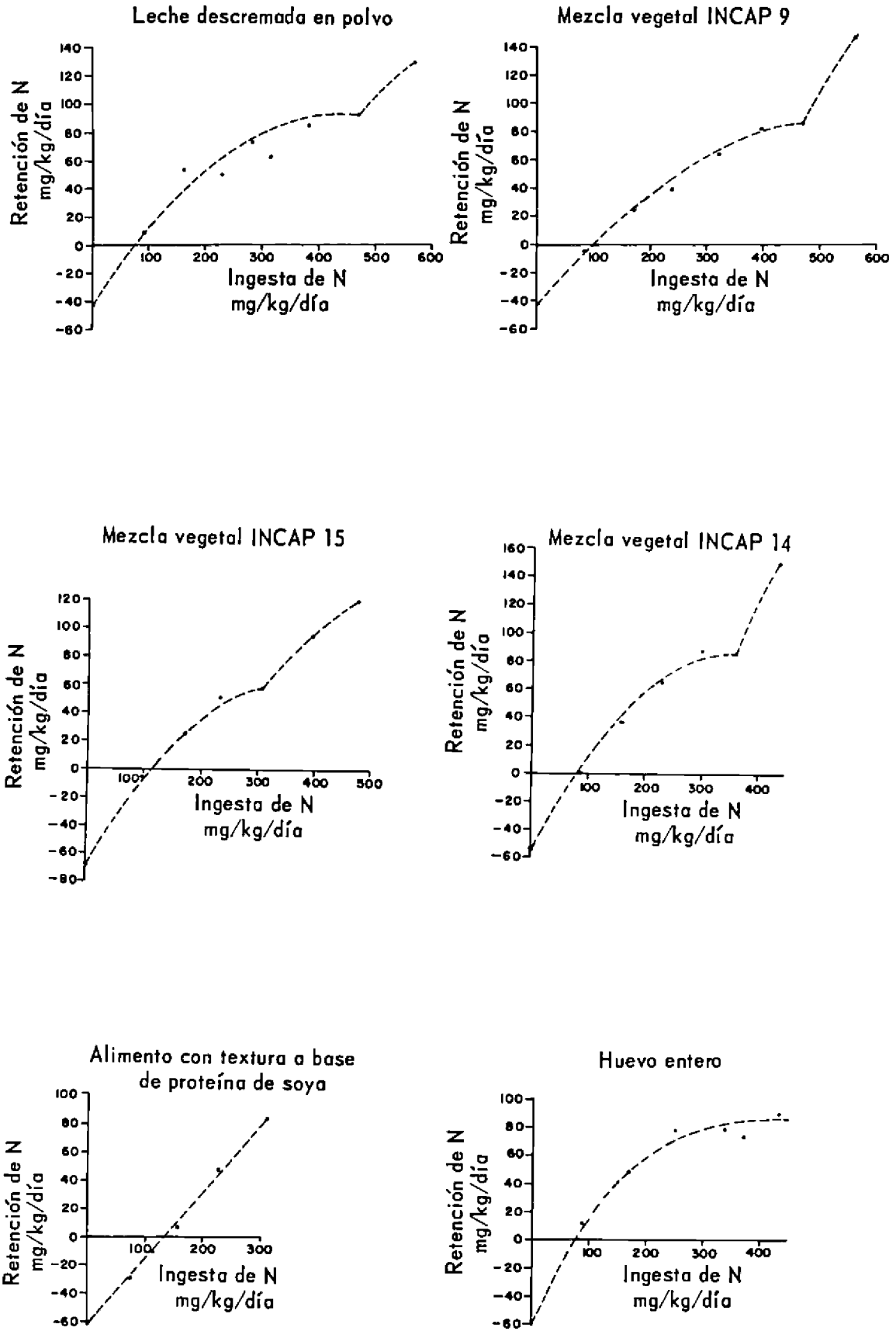
GRAFICA 9

Indice de balance nitrogenado en humanos adultos.

método se basa en la técnica de balance nitrogenado, está sujeto a que factores que alteran el balance de nitrógeno afecten las cifras obtenidas.

Valor Proteínico Neto (VPN) y Utilización Proteínica Neta (UPN)

Allison (1, 8) y Allison y Anderson (22), por su parte, también demostraron que entre la ingesta (Ni) y el balance nitrogenado (BN) existe una relación linear en la región de balance nitrogenado negativo o ligeramente positivo. Esta relación la indica la ecuación No. 1 que se presenta en el Cuadro 7. La ecuación No. 2 muestra la relación entre el BN y el Na. La resta de la ecuación No. 1, de la No. 2, da origen a las ecuaciones Nos. 3 y 4, según las cuales el nitrógeno ingerido (Ni) es igual al nitrógeno absorbido (Na) dividido por la digestibilidad (D). Al sustituir el Ni de la ecuación No. 1 por el Ni de la ecuación No. 4 se obtiene la ecuación No. 5. La transferencia de términos origina la ecuación No. 6, donde se nota que el valor del lado izquierdo es igual a valor biológico (VB). En la ecuación No. 7 la constante K' es igual al valor biológico multiplicado por digestibilidad, que, por definición, es la utilización proteínica neta (UPN).



GRAFICA 10

Relación entre la ingesta de nitrógeno y el balance nitrogenado en niños .

Por consiguiente, K' es igual a UPN. La misma secuencia de ecuaciones puede desarrollarse para obtener el valor proteínico neto (VPN) de la fórmula de valor biológico. Miller y Bender (24) y Bender (25) desarrollaron un método rápido para determinar la UPN. En vista de que estos autores calcularon la retención de nitrógeno analizando el nitrógeno del cuerpo del animal, más bien que induciendo el N retenido por diferencia del N ingerido, y de la suma del N fecal y urinario, el método ha sido llamado Utilización Proteínica Neta (UPN). Esta medida equivale al valor proteínico neto (VPN) pero el valor numérico de los dos índices no es necesariamente el mismo. Para calcular las pérdidas endógenas, los mismos autores (24, 25) propusieron el uso de un grupo de animales alimentados con dietas aproteínicas. Al final del Cuadro la utilización proteínica neta está definida como sigue: N del carcás (Nc) del grupo de prueba, menos el N del carcás del grupo alimentado con la dieta aproteínica + N consumido por este último grupo, todo ello dividido por el N consumido por el grupo de prueba.

CUADRO 7

Valor proteínico neto (VPN) y utilización proteínica Neta (UPN)

1.	BN	$= K' (Ni) = Ne_0$
2.	BN	$= K (Na) - Ne_0$
3.	K (Na)	$= K' (Ni)$
4.	$\frac{K'}{K}$	$= \frac{Na}{Ni}$ D o Ni $= \frac{Na}{D}$
5.	BN	$= K' \frac{(Na)}{D} - Ne_0$
6.	$\frac{BN + Ne_0}{Na}$	$= \frac{K'}{D}$
7.	VB	$= \frac{K'}{D}$ o (VB) (D) = K' $\therefore$ K' = UPN $\therefore$ (VB) (D) = VPN o UPN
8.	UPN	$= \frac{\text{Nc del grupo de prueba - Nc del grupo aproteínico + N consumido por grupo aproteínico}}{\text{N consumido por grupo de prueba}}$

K' = Coeficiente.
D = Digestibilidad.
Nc = N en el carcás.

El efecto del nivel de proteína sobre la UPN de la caseína, con y sin la adición de vitaminas y minerales a la

dieta, se presenta en el Cuadro 8 (26). Según se observa, los valores de UPN disminuyeron a causa de la falta de vitaminas y de minerales en la dieta. Asimismo, dichos valores se redujeron conforme aumentaban las calorías derivadas de la proteína, ajeno a la presencia o ausencia de minerales y vitaminas. Otros investigadores también han observado que la UPN disminuye conforme el contenido de proteína en la dieta aumenta, tal como sucede con los otros métodos de evaluación proteínica (27, 28). Como se muestra en la Gráfica 11 (27) algunos datos al respecto indican también que el tiempo de experimentación influye sobre los valores de UPN. Se aprecia, en primer término, el efecto del nivel proteínico: este induce inicialmente un incremento, pero luego disminuye; en segundo lugar, se observa el efecto de tiempo, que también reduce los valores de UPN para cualquier proteína que se estudie.

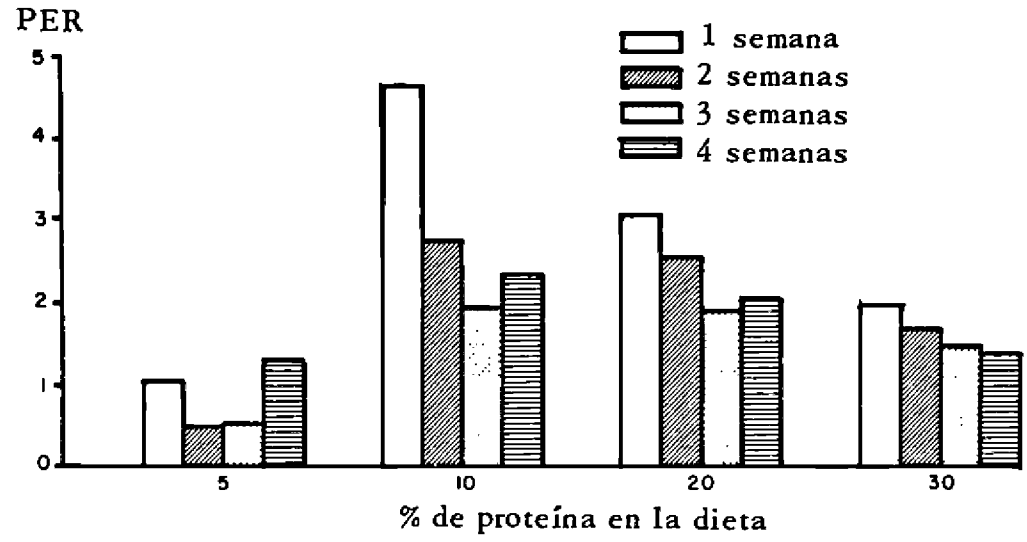
Asimismo, los valores de UPN parecen estar influenciados por el contenido de lisina de las proteínas deficientes en este aminoácido (26). El Cuadro 9 suministra datos acerca de esta relación, indicativos de que la UPN y la razón proteínica neta (RPN) ascienden conforme el contenido de lisina aumenta. El coeficiente de correlación entre UPN y lisina fue de 0.85, y entre RPN y lisina, de 0.91. Los valores de UPN también son sensibles al contenido de aminoácidos azufrados (29,30). Los datos en la Gráfica 12 muestran una buena correlación entre el nivel de aminoácidos azufrados y los valores de UPN. Estas relaciones indican que el método es, pues, sensible a la calidad proteínica, o sea al patrón de aminoácidos esenciales. El Cuadro 10 presenta también ecuaciones que relacionan la UPN con el VB, en las cuales se nota que la UPN es igual al VB multiplicada por D.

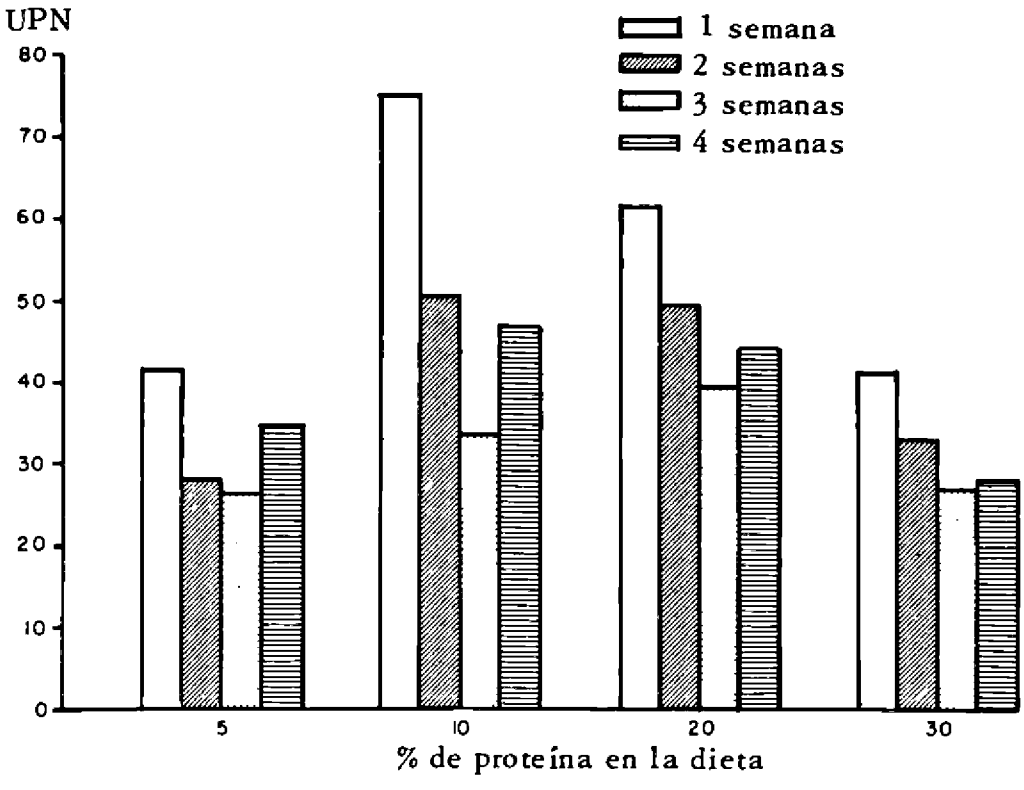
CUADRO 8

Efecto de la presencia o ausencia de vitaminas y minerales sobre la UPN de la caseína administrada a varios niveles de ingesta proteínica

Calorías derivadas de la proteína %	Vitaminas o minerales	Ingesta de alimento g	Aumento en peso g	Nitrógeno en el carcás g	UPN
10	-	27	-3	1.17	54 ± 3.9*
10	+	40	9	1.36	67 ± 5.3
20	-	24	-3	1.18	30 ± 2.8
20	+	46	20	1.67	48 ± 2.8
40	-	23	-6	1.20	17 ± 2.3
40	+	48	23	1.69	24 ± 1.0
80	-	15	-11	1.00	2 ± 1.4
80	+	31	10	1.42	11 ± 1.3

* Promedio ± Error Estándar.
Tomado de: Morrison, A. B., Z. I. Sabry, y J. A. Campbell (27).





GRAFICA 11

Utilización proteínica neta (UPN) e índice de eficiencia proteínica (PER) obtenidos con diferentes niveles de caseína en la dieta y durante 4 semanas .

Indice de Eficiencia Proteínica

En las primeras pruebas realizadas para medir el valor nutritivo de las proteínas, Osborne, Mendel y Ferry (31) usaron gráficas simples en las que trazaban el curso del crecimiento de los animales en función del tiempo. Se encontró

CUADRO 9

Sensibilidad del índice de eficiencia proteínica (PER), utilización proteínica neta (UPN) y razón proteínica neta (RPN) al contenido de lisina en la dieta

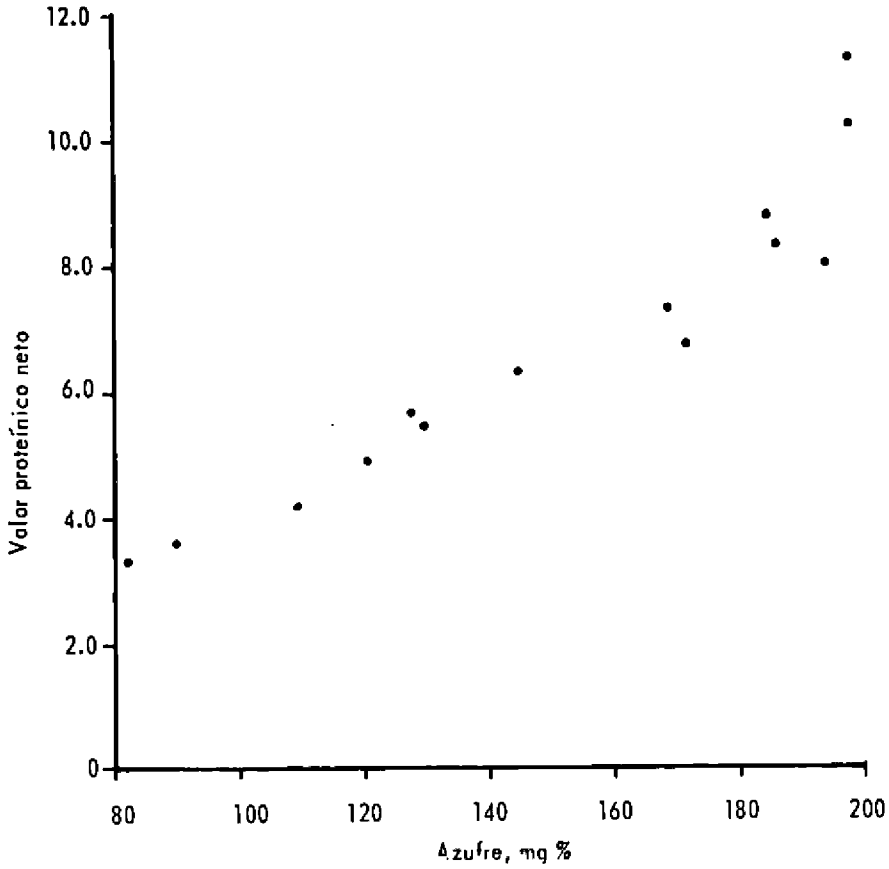
Contenido de lisina %	UPN	RPN	PER
0.32	21 ± 2.4	1.5 ± 0.12	0.62 ± 2.06*
0.42	28 ± 2.4	1.84± 0.09	0.94 ± 0.02
0.52	35 ± 3.3	2.34± 0.07	1.29 ± 0.03
0.72	48 ± 1.9	2.98± 0.08	1.81 ± 0.03

UPN vrs. lisina r = 0.85

RPN vrs. lisina r = 0.91

PER vrs. lisina r = 0.97

* Promedio ± Error Estándar.



Tomado de: Miller, D.S., y D. J. Naismith (31).

GRAFICA 12

Relación entre el contenido de azufre de los alimentos y el valor proteínico neto (VPN).

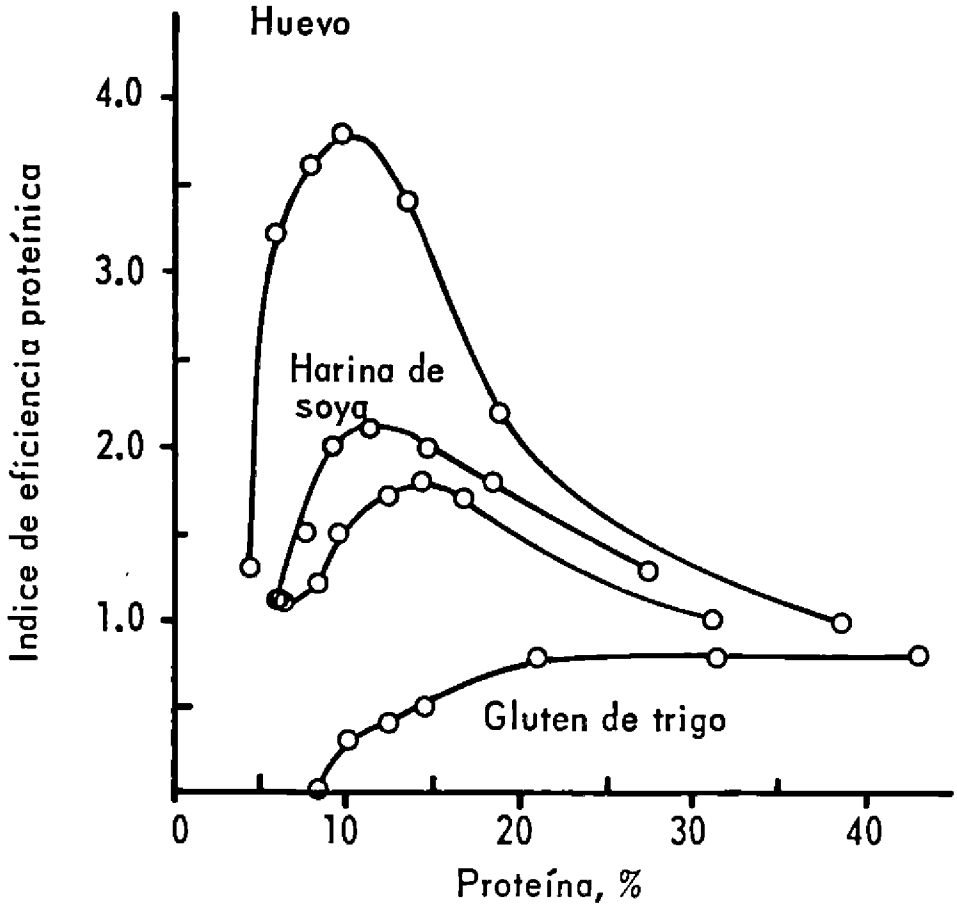
así que la tasa de crecimiento de un animal bajo condiciones definidas, proporcionaba un sistema relativamente sencillo para medir el valor nutritivo de la proteína en la dieta.

A pesar de que la tasa de crecimiento o el incremento ponderal permitían una separación cruda de las proteínas de diferente calidad, pronto se hizo evidente que este sistema no era lo suficientemente discriminativo. Con base en la experiencia adquirida, los mismos autores (31) propusieron en 1919 que era factible obtener una discriminación más crítica y exacta de las proteínas si la respuesta observada, es decir, si el aumento en peso en un período dado de tiempo, se expresaba a partir de la cantidad de proteína consumida en ese mismo período de tiempo. Al proponer este método,los investigadores citados demostraron que la variación evidente en el uso de pesos absolutos se reducía significativamente al expresarlos en base a la proteína consumida. El índice propuesto por Osborne, Mendel y Ferry (31) para la evaluación del valor nutritivo de la proteína se conoce hoy día como el PER o índice de eficiencia proteínica, y constituye una expresión de los aumentos ponderales obtenidos por unidad de proteína ingerida.

Según el método original, el PER era determinado usando varios niveles de la proteína bajo prueba, y el valor máximo así obtenido se consideraba como la mejor estimación del valor de la proteína. Como sucede hoy día, en ese entonces los valores máximos para las diferentes proteínas se encontraban a diferentes concentraciones en la dieta. En la Gráfica 13 se incluyen los resultados de un estudio a este particular, en el que se investigaron diferentes niveles de tres proteínas (huevo, harina de soya y gluten de trigo). Según se observa, conforme la tasa de crecimiento aumenta en las dietas de contenido proteínico más alto, el índice de eficiencia alcanza un valor máximo; luego desciende con todas las proteínas, salvo con las de peor calidad, que en este caso fueron las del gluten de trigo (32).

Además, se aprecia que no existe una única tasa de crecimiento que resulte en un índice máximo. Si en lugar de relacionar el PER, se relaciona el incremento en proteína, se encuentra que existe una tasa de ingesta proteínica que da un porcentaje máximo de utilización para crecimiento, para las tres proteínas estudiadas. La utilización máxima de éstas (Gráficas 13 y 14) ocurre cuando el organismo absorbe de cada una de 0.75 a 1.0 g diariamente. En la Gráfica 14 también se nota la diferencia en PER que se obtiene cuando se usa un método de alimentación controlada (en círculos) o *ad libitum*, administrando 10% de proteína en la dieta. Los datos ilustran que el nivel de absorción proteínica - condicionada arbitrariamente por el método - resulta en índices de utilización de la proteína en la línea ascendente, que no son comparables al máximo que puede obtenerse con una mayor ingesta.

Otro factor que influencia el PER es la edad inicial de la rata (33) (Gráfica 15). Generalmente se especifica el uso de ratas destetadas, pero esta designación puede tener diferentes significados en diferentes laboratorios. En los



Adaptada de: Barnes, R. H., y D. K. Bosshardt (34).

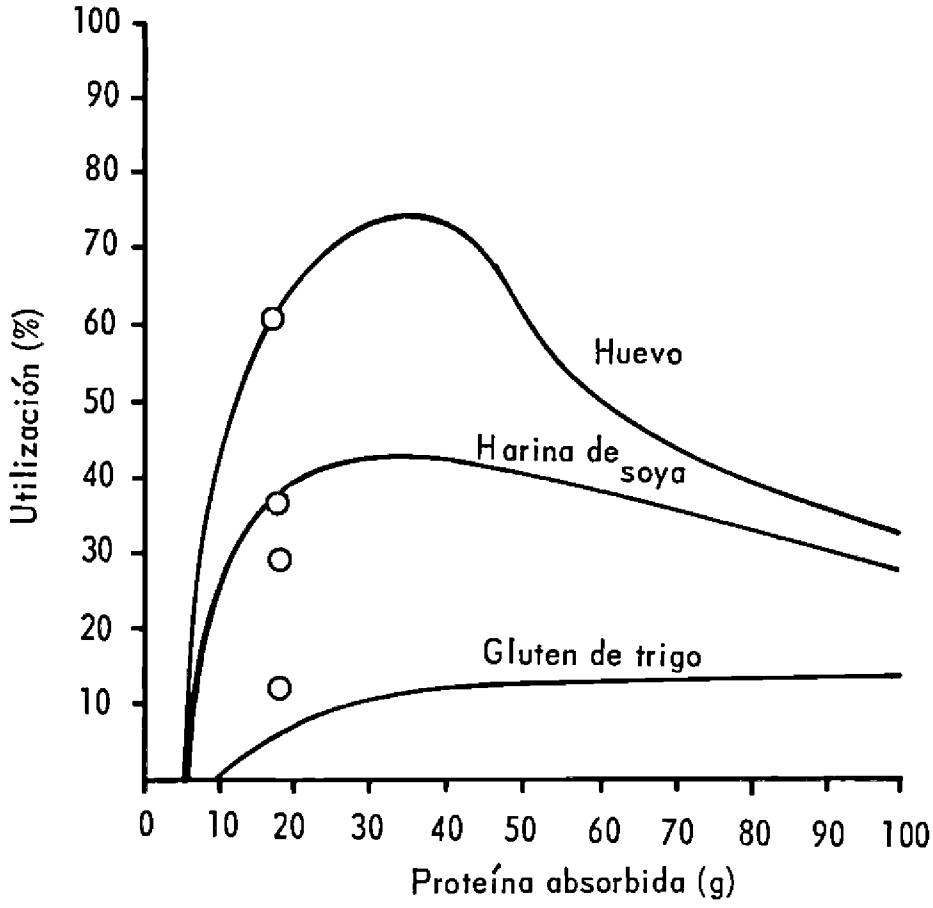
GRAFICA 13

Indice de eficiencia proteínica (PER).

resultados que se presentan en dicha Gráfica, se nota que las diferencias en PER pueden ser altamente significativas entre las ratas de 22, 29, 36, ó 43 días de edad inicial.

Tal como lo indica la Gráfica 16, el período de experimentación también interfiere con el resultado obtenido, notándose que los valores disminuyen con el tiempo, según se encontró también al aplicar otros métodos de evaluación (27, 33). Para determinar el PER se ha establecido, por lo tanto, un período de 28 días de experimentación.

Varios investigadores han demostrado que la raza de ratas que se utilice puede dar valores diferentes de evaluación (34). El método ha sido extensamente analizado por muchos investigadores (35-37) y debido a su simplicidad y reproductibilidad en condiciones controladas y buenas predicciones de calidad proteínica, lo ha convertido en uno de los métodos que más comúnmente se utilizan para evaluar la calidad de las proteínas.

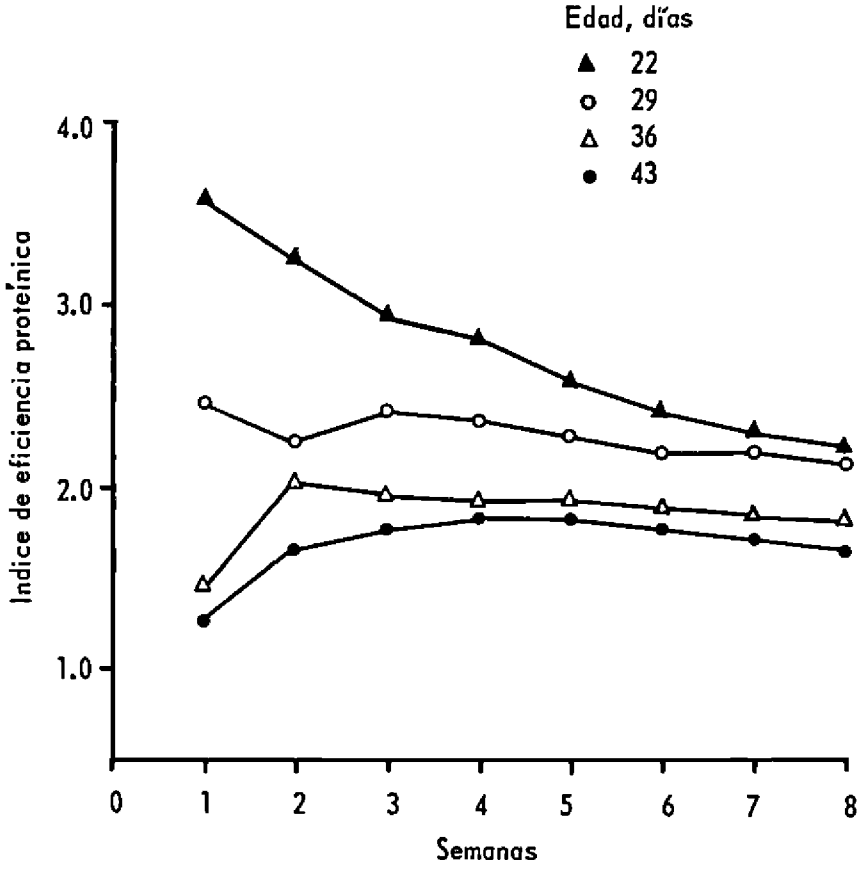


GRAFICA 14

Efecto de la ingesta de proteína sobre su utilización por la rata.

Una modificación al método del PER es la expresión NER, en la que el aumento en peso en función del nitrógeno consumido se relaciona a varios niveles de nitrógeno en la dieta en un período de 14 a 28 días, siendo el índice de eficiencia de nitrógeno (NER) la tangente de la línea de respuesta. Esta modificación es similar al índice de balance nitrogenado, con la diferencia de que en este caso se miden las excreciones de nitrógeno, y en el otro, los cambios en peso. En la Gráfica 17 se incluyen datos para variedades de arroz, los cuales indican que la proteína es de diferente calidad; esto no podría detectarse con los métodos convencionales como son la UPN y el PER, dado que la concentración de proteína en el cereal es baja.

El uso de la respuesta linear tiene la ventaja de que no es afectada por la ingesta de alimento; además, a niveles altos proporciona información sobre los efectos tóxicos que el producto pueda tener.



Tomada de: Chapman, D. G., R. Castillo, y J. A. Campbell (35).

GRAFICA 15

Efecto de la edad inicial de la rata sobre el índice de eficiencia proteínica (PER) *de la caseína* .

Se han efectuado estudios experimentales demostrativos de que el PER está relacionado a la UPN, y ambos al valor biológico (VB) o a cualquier otro método que se desee utilizar. En el Cuadro 11 se presenta una serie de expresiones algebraicas que permiten, por ejemplo, relacionar la UPN y el NER, este último usado como equivalente del PER (38). Por definición, la UPN es igual al nitrógeno retenido que se obtiene por la diferencia entre valores obtenidos de animales alimentados con o sin nitrógeno en la dieta. Por definición también, el NER se define como la tasa entre el aumento en peso y la cantidad de nitrógeno ingerido (ecuación No. 2). Resolviendo las dos ecuaciones por Ni se obtienen las ecuaciones Nos. 3 y 4. En la ecuación No. 5 el Nr se expresa como un cambio en nitrógeno (N final = Nn; N inicial = N_0) (Nn - N_0) y la ganancia ponderal (GP) por cambios en el contenido del carcás en cuanto a agua, grasa, proteína y ceniza, siendo la relación igual al porcentaje de nitrógeno del carcás, o sea Nc. Usando esta derivación en las ecuaciones Nos. 3 ó 4 se obtiene la ecuación No. 6. Sin embargo, si el porcentaje de nitrógeno del carcás es independiente de la concentración de nitrógeno en la dieta, la ecuación No. 4 puede expresarse como ecuación No. 7, en la que Pa es el peso de los animales con la dieta aproteínica, y P_0 y Pn los pesos

CUADRO 10

Relación entre la utilización proteínica neta (UPN) y el valor biológico (VB)

$$UPN = \frac{Nr}{Ni} \quad \therefore \quad Nr = UPN \times Ni$$

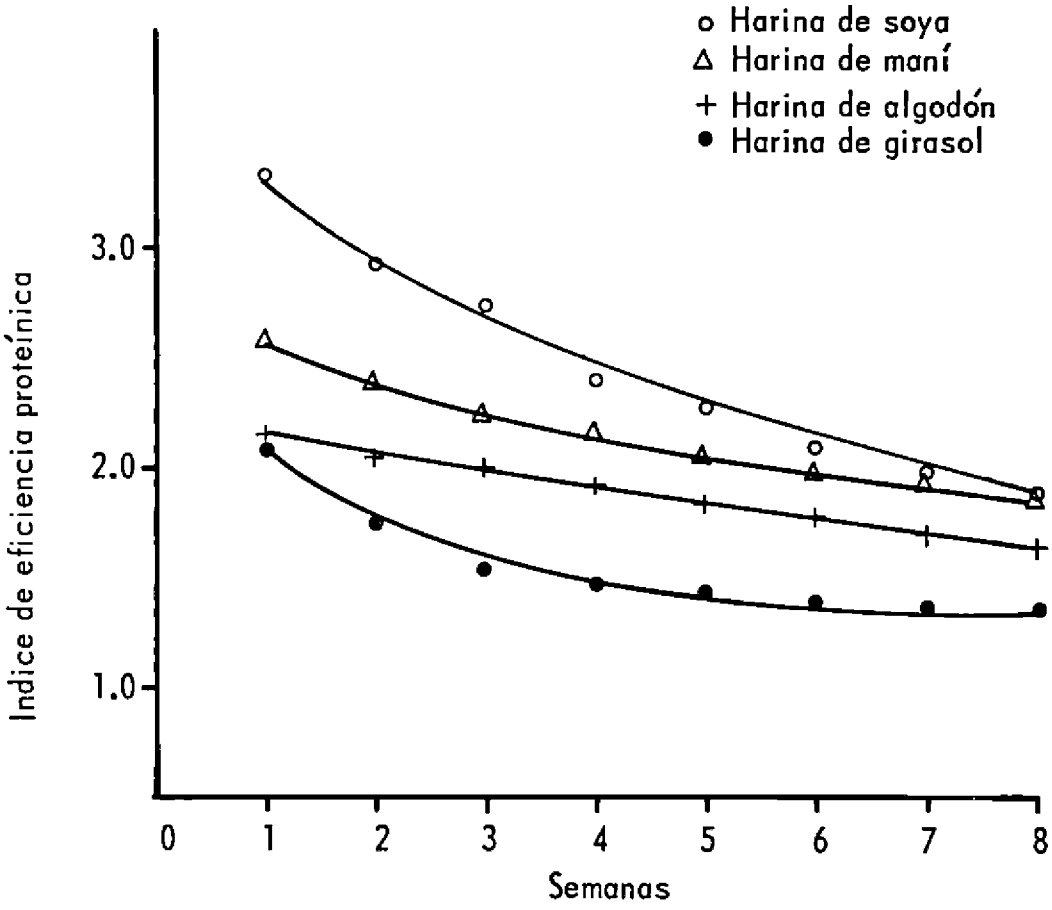
$$VB = \frac{Ni - (Nf - Nm) - (Nu - Ne)}{Ni - (Nf - Nm)} = \frac{Nr}{Na}$$

$$VB = UPN \times \frac{Ni}{Na} \; ; \quad D = \frac{Na}{Ni}$$

$$\therefore \quad VB = UPN \times \frac{1}{D}$$

$$o \quad UPN = VB \times D$$

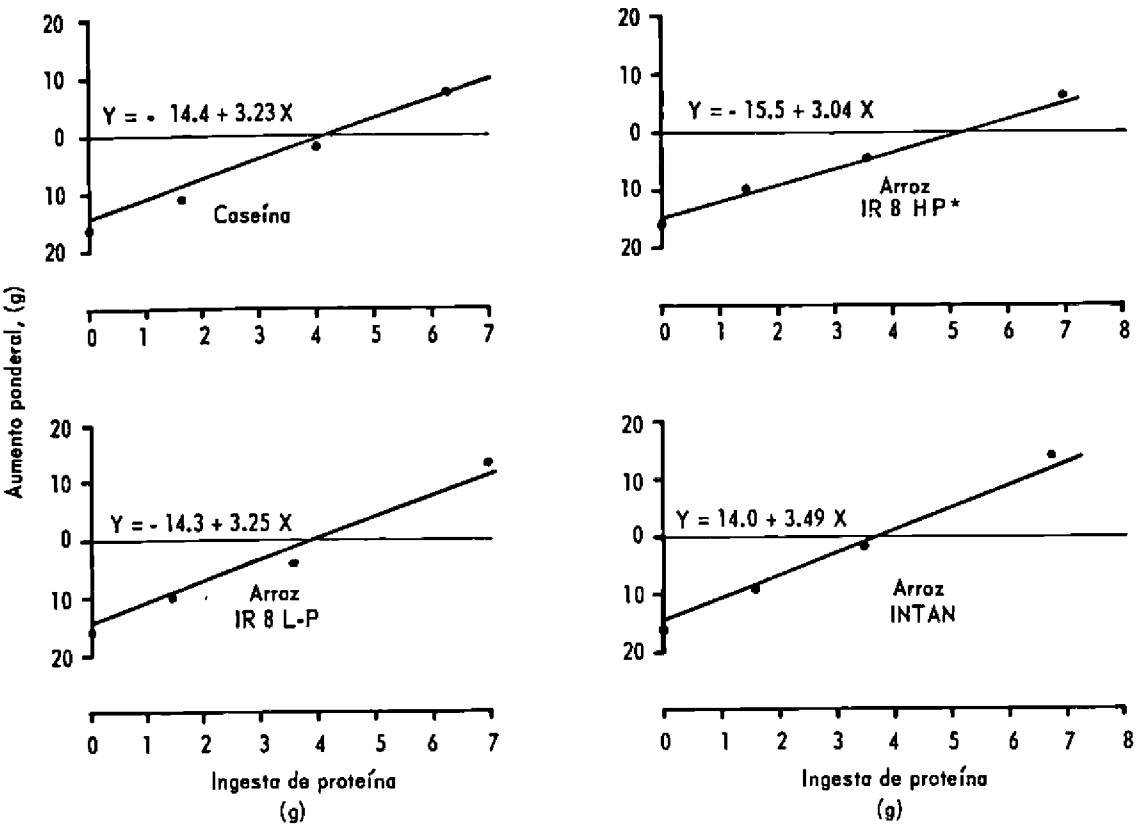
Nr = N retenido.



Tomada de: Braham, J. E., *et al.* (39).

GRAFICA 16

Efecto del tiempo sobre el índice de eficiencia proteínica (PER).



* Variedades de arroz que comúnmente se identifican como IR 8 HP, L-P e INTAN, respectivamente.

GRAFICA 17

Indice de nitrógeno y aumento ponderal obtenidos con diferentes variedades de arroz .

iniciales y finales de los animales que están consumiendo la proteína. Usando esta relación en un estudio que incluyó 23 proteínas diferentes, se encontró que la correlación entre NER y UPN determinados experimentalmente, era de 0.95. La correlación entre la UPN y el NER experimentales y calculados varió en todas las posibles combinaciones entre 0.74 y 0.94, lo que indica que los métodos pueden situar a las proteínas en el mismo orden en cuanto a valor nutritivo. Además, todos dan el mismo significado, teniendo en cuenta que es necesario estandarizar y definir bien las condiciones experimentales usadas (38).

Los datos en cuestión indican que, en términos generales, los métodos de evaluación proteínica están relacionados entre sí, clasificando las proteínas en el mismo orden, por lo menos para el mismo animal experimental. Sin embargo, existe duda sobre la aplicabilidad de los resultados obtenidos en una especie de animal, a otra, en particular entre el animal y el ser humano.

Esta relación será tema de otro trabajo (39) cuyo objetivo es indicar que por lo menos el valor biológico de una proteína, en una especie, es igual para otra especie.

Conviene tener presente, sin embargo, que no todos los métodos podrían usarse para este propósito debido al parámetro que utilizan para medir la calidad de la proteína. No obstante, los que darían valores numéricos iguales o similares son aquéllos en los que el valor nutritivo de la proteína se determina por medio de una ecuación de regresión, calculada por cambios en relación a variaciones de ingesta proteínica. A título de ejemplo se presenta la Gráfica 18 en la que se da a conocer el índice de balance de nitrógeno obtenido con caseína en ratas jóvenes y en perros; según se aprecia, la inclinación de la línea - que en perros está representada por el balance de nitrógeno versus ingesta - y en la rata por el aumento ponderal versus la ingesta de nitrógeno, es similar.

CUADRO 11

Relación entre el índice de eficiencia de nitrógeno (NER) y la utilización proteínica neta (UPN)

1. $UPN = \frac{Nr}{Ni}$

2. $NER = \frac{Gp}{Ni}$

3. $\frac{Nr}{UPN} = \frac{GP}{NER}$

4. $UPN = \frac{(Nr)}{(Gp)}$

4a. $\frac{UPN}{NER} = \frac{Nr}{Gp}$

5. $Gp = (Af - Ai) + 6.25\ (Nf - Ni) + (Gf - Gi) + (Cf - Ci)$

6. $Gp = \Delta\ A + 6.25\ \Delta\ N + \Delta\ G + \Delta\ C$

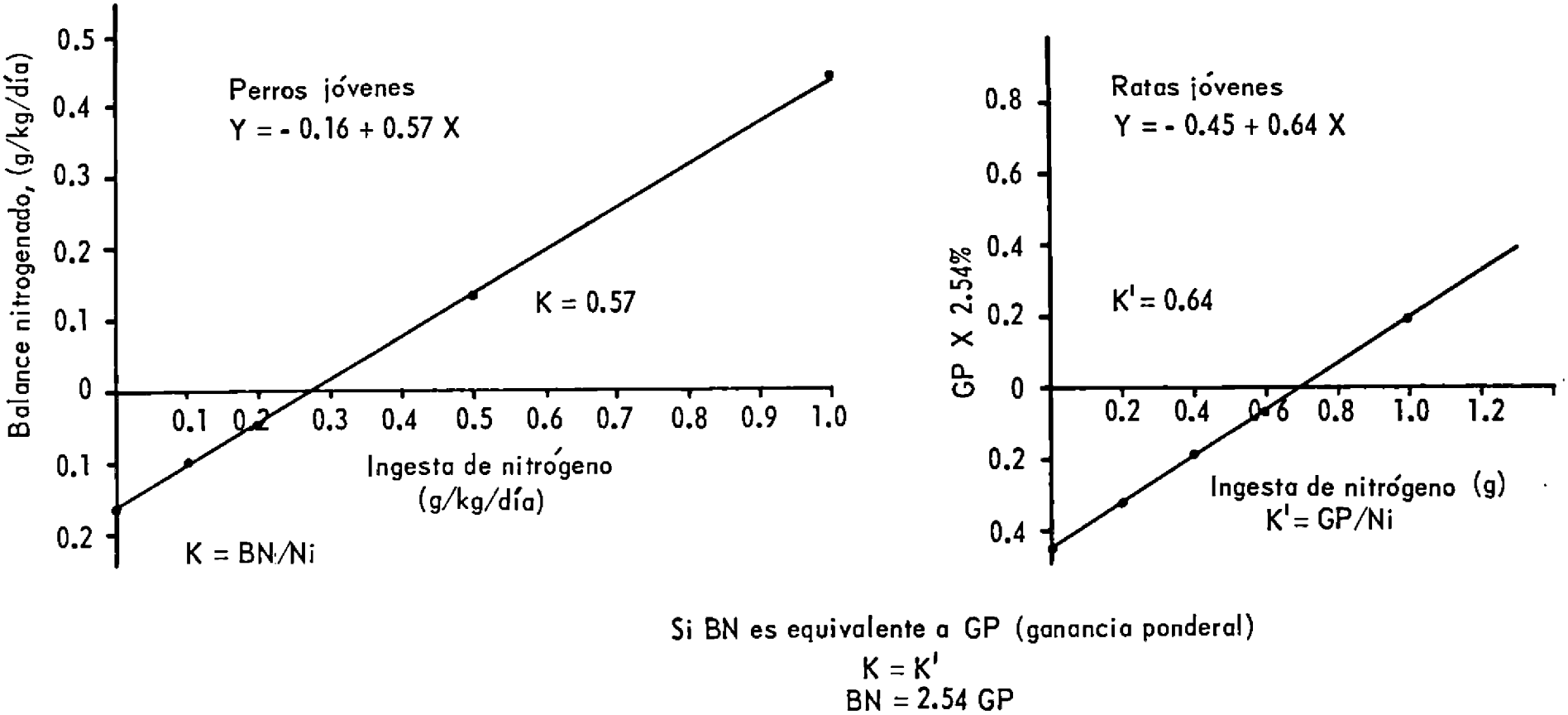
7. $Nr = \Delta$ NC (por definición) = Nc = Cambio en el nitrógeno del carcás

8. $\frac{UPN}{NER} = \frac{\Delta\ Nc}{\Delta A + 6.25\ \Delta N + \Delta G + \Delta C}$ = N en aumento del peso (%) (Nc Gp)

9. $UPN = NER \times \%\ (Nc - Gp)$ = Nc Gp

Tomado de: Bressani, R. *et al.* (38).

UPN = Utilización proteínica neta.
Nr = Nitrógeno retenido.
Ni = Nitrógeno ingerido.
NER = Indice de eficiencia de nitrógeno o "Nitrogen Efficiency Ratio".
Gp = Ganancia en peso.
Af = Agua final (contenido de).
Ai = Agua inicial (contenido de).
Nf = Nitrógeno final (contenido de).
Ni = Nitrógeno inicial (contenido de).
Gf = Grasa final (contenido de).
Gi = Grasa inicial (contenido de).
Cf = Ceniza final (contenido de).
Ci = Ceniza inicial (contenido de).
Nc = Cambio en el N del carcás.



Si BN es equivalente a GP (ganancia ponderal)

$K = K'$

$BN = 2.54\ GP$

GRAFICA 18

Indice de balance de nitrógeno en perros, índice de nitrógeno y crecimiento en ratas (utilizando caseína).

En la misma Gráfica se muestra la hipotésis que se desea demostrar. A la derecha (perros) se indica la relación entre el N ingerido y el balance nitrogenado. En este caso la tangente del ángulo (K) la señala BN/Ni. A la izquierda (ratas) se muestra la relación entre la ganancia ponderal (GP)/(Ni). La tangente en este caso (K') la marca la relación (GP)/(Ni). La comparación de las dos ecuaciones revela que para que K y K' sean iguales, BN y GP deben ser proporcionalmente iguales a las dos ingestas de nitrógeno. Ya que BN es parte de GP, ésta puede convertirse en BN multiplicando GP por un factor equivalente al contenido de nitrógeno del aumento en peso que, según se ha determinado, es de 2.54% (38). Al usar este factor y calcular las regresiones, se encuentra que para caseína, en perros, ésta es de Y = 0.16 + 0.57 X, y para la misma proteína en ratas, de Y = 0.45 + 0.64 X.

En otras palabras, el valor nutritivo de una proteína es igual entre las diferentes especies, dentro de ciertos límites o de una variabilidad experimental no controlada. Estos datos, aunque limitados, sugieren que en programas de evaluación proteínica, se puede usar el animal experimental y predecir con bastante exactitud que el valor nutritivo de la proteína en estudio es igual para el ser humano, en el mismo estado fisiológico o desarrollo que el animal de experimentación utilizado.

Referencias

1. Allison, J. B. Biological evaluation of proteins. *Physiol. Rev.*, 35:664, 1955.

2. Sirbu, E. R., S. Margen, and D. H. Calloway. Effect of reduced protein intake on nitrogen loss from the human integument. *Am. J. Clin. Nutr.*, 20:1158, 1967.

3. Mitchell, H. H., and T. S. Hamilton (with W. T. Haines). The dermal excretion under controlled environmental conditions of nitrogen and minerals in human subjects with particular reference to calcium and iron. *J. Biol. Chem.*, 178:345, 1949

4. Cuthberston, D. P., and W. S. W. Guthrie. The effect of variations in protein and salt intake on the nitrogen and chloride content of sweat. *Biochem. J.* 28:1444, 1934.

5. Costa, G. Hypothetical pathway of nitrogen metabolism. *Nature*, 188:549, 1960.

6. Bressani, R., J. E. Braham, L. G. Elías, and R. Balconi. Urinary nitrogen and sulfur excretion in dogs under different dietary treatments. *J. Nutrition*, 87:77, 1965.

7. Forbes, R. M., L. Vaugham, and M. Yohe. Dependence of biological value on protein concentration in the diet of the growing rat. *J. Nutrition*, 64:291, 1958.

8. Allison, J. B. Calories and protein nutrition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 69:1009, 1958.

9. Bressani, R., and J. E. Braham. Effect of water intake on nitrogen metabolism in dogs. *J. Nutrition*, 82:469, 1964.

10. Harper, A. E. Balance and imbalance of amino acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 69: 1025, 1958.

11. Bressani, R. Effect of amino acid imbalance on nitrogen retention. I. Effect of a relative deficiency of tryptophan in dogs. *J. Nutrition*, 78:365, 1962.

12. Kumta, U. S., A. E. Harper, and C. A. Elvehjem. Amino acid imbalance and nitrogen retention in adult rats. J. Biol. Chem., 233:1505, 1958.

13. Allison, J. B., and W. H. Fitzpatrick. Dietary Proteins in Health and Disease. I.N. Kugelmass (ed.). Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, Publisher, 1960, 86 p.

14. Livingston, D. M. S., M. F. Fuller, and R. M. Livingstone. A note on the growth of pigs in metabolism cages. Animal Prod., 11:551, 1969.

15. Thomas, K. Uber die biologische Wertigkeit der stickstoff. Substanzen in verschiedenen Nährungsmittel. Arch. Anat Physiol., Physiol. Abst., 1909, p. 219.

16. Mitchell, H. H. A method of determining the biological value of protein. J. Biol. Chem., 58:873, 1923-24.

17. Mitchell, H. H. The nutritive value of proteins. Physiol. Rev., 4:424, 1924.

18. Mitchell, H. H. Determination of the nutritive value of the proteins of food products. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 16:696, 1944.

19. Henry, K. M., and S. K. Kon. Effect of level of protein intake and age of rat on the biological value of proteins. Brit. J. Nutr., 11:305, 1957.

20. Bressani, R., F. Viteri, D. Wilson, and J. Alvarado. The endogenous urinary and fecal nitrogen excretion of children and the nutritive value of various animal and vegetable proteins for human nutrition. Manuscrito en preparación.

21. Forbes, R. M., and M. Yohe. Net protein value of blood fibrin for the albino rat: evaluation of nitrogen balance and carcass analysis methods. J. Nutrition, 55:493, 1955.

22. Allison, J. B., and J. A. Anderson. The relation between absorbed nitrogen, nitrogen balance and biological value of proteins in adult dogs. J. Nutrition, 29: 413, 1945.

23. Hoffman, W. S., and G. C. McNeil. The enhancement of the nutritive value of wheat gluten by supplementation with lysine, as determined from nitrogen balance indices in human subjects. J. Nutrition, 38:331, 1949.

24. Miller, D. S., and A. E. Bender. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. Brit. J. Nutr., 9:382, 1955.

25. Bender, A. E. Relation between protein efficiency and net protein utilization. Brit. J. Nutr.. 10:135, 1956.

26. Morrison, A. B., Z. I. Sabry, and J. A. Campbell. Evaluation of protein in foods. VII. Factors influencing net protein utilization as determined by carcass analysis. Canad. J. Biochem. Physiol., 40: 1663, 1962.

27. Braham, J. E., L. G. Elías, S. de Zaghi, and R. Bressani. Effect of protein level and duration of test on carcass composition, net protein utilization (NPU) and on protein efficiency ratio (PER). Nutr. Dieta, 9:99, 1967.

28. Morrison, A. B., Z. I. Sabry, N. T. Gridgeman, and J. A. Campbell. Evaluation of protein foods. VIII. Influence of quality and quantity of dietary protein on net protein utilization. Canad. J. Biochem. Physiol., 41:275, 1963.

29. Miller, D. S., and D. J. Naismith. A correlation between sulphur content and net dietary-protein value. Nature, 182:1786, 1958.

30. Miller, D. S., and G. Donoso. Relationship between the sulphur/nitrogen ratio and the protein value of diets. J. Sci. Fd Agric., 14:345, 1963.

31. Osborne, T. B., L. B. Mendel, and E. L. Ferry. A method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. J. Biol. Chem., 37:223, 1919.

32. Barnes, R. H., and D. K. Bosshardt. The evaluation of protein quality in the normal animal. Ann. N. Y. Acad. Sci., 47:273, 1946.

33. Chapman, D. G., R. Castillo, and J. A. Campbell. Evaluation of protein in foods. I. A method for the determination of protein efficiency ratios. Canad. J. Biochem. Physiol., 37:679, 1959.

34. Jansen, G. R. Influence of rat strain and protein level on protein efficiency ratio (PER) determination. J. Nutrition, 78:231, 1962.

35. Morrison, A. B., and J. A. Campbell. Evaluation of protein in foods. V. Factors influencing the protein efficiency ratio of foods. J. Nutrition, 70:112, 1960.

36. Keane, K. W., C. J. Smutko, G. H. Krieger, and A. E. Denton. The addition of water to purified diets and its effect upon growth and protein efficiency ratio in the rat. J. Nutrition, 77:18, 1962.

37. Campbell, J. A. *Methodology of Protein Evaluation. A Critical Appraisal of Methods for Evaluation of Protein in Foods.* Beirut, Lebanon, American University of Beirut, June, 1963. 104 p. (Publication No. 21).

38. Bressani, R., J. E. Braham, L. G. Elías, and S. de Zaghi. Relationship between net protein utilization (NPU) and nitrogen efficiency ratio (NER). Nutr. Dieta, 7:161, 1965.

39. Viteri, F. E. y J. Alvarado. Evaluación de la calidad de la proteína en humanos, con énfasis en metodología. Véase este mismo volumen p. 53.