

# **Estudio de la proteína extraída de las semillas de lino.**

## **Valor nutritivo e inocuidad**

**M. E. SAMBUCETTI, G. GALLEGOS y J. C. SANAHUJA**

Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

### **RESUMEN**

Se describe el estudio realizado sobre la proteína aislada de la semilla de lino (*Linum usitatissimum* L.) como posible fuente proteica para la alimentación humana.

Para obtener el valor nutritivo se determinaron los siguientes parámetros: composición de amino ácidos esenciales, Utilización Proteica Neta Razón de Eficiencia Proteica y Número Químico.

Para determinar la inocuidad se realizaron ensayos toxicológicos sobre animales de ambos sexos alimentados con la proteína problema y otros con caseína como control durante 28 días. Las pruebas realizadas fueron: análisis hematológicos, peso de órganos, composición del hígado y análisis histológico de hígado y riñón.

Los resultados obtenidos mostraron que el valor nutritivo es inferior al de la caseína observándose deficiencias en el contenido de lisina, amino ácidos azufrados, treonina y leucina. En cuanto a la inocuidad las observaciones realizadas no señalaron signos de daño patológico a excepción de una ligera infiltración grasa en hígado. Se considera que a este respecto se requieren ensayos de mayor duración que los realizados para obtener resultados definitivos.

### **INTRODUCCION**

El aislamiento de proteínas vegetales con fines industriales, se viene realizando desde hace ya más de 3 décadas. Sin embargo es recién en los últimos años que ha cobrado una gran importancia en relación con su utilización alimenticia, en es-

pecial a partir de concentrados proteínicos de semillas de oleaginosas. Es así como se han publicado y patentado procedimientos destinados a tal finalidad, partiendo de materias primas tales como soja, maní, algodón, etc.

Los nuevos productos obtenidos poseen una serie de características ventajosas ya que debido a las técnicas utilizadas, a la vez que se concentran las proteínas se eliminan hidratos de carbono no digeribles, sabores desagradables y sustancias peligrosas para la salud (1).

Las proteínas aisladas, que se pueden obtener en forma de filamentos, gránulos o polvo, poseen además una serie de características funcionales que le confieren propiedades gelificantes, estabilizantes, emulsificantes, espesantes e hidratantes, que permiten darles un amplio uso en la preparación de alimentos.

En nuestro país Bertoni y Cattáneo (2) aislaron la proteína de las semillas de lino (*Linum usitatissimum* L.) mediante la extracción en medio alcalino, precipitación al pH isoeléctrico y posteriores lavados con etanol. Obtuvieron así un producto de características organolépticas adecuadas para su utilización en la alimentación humana.

No son muchos los trabajos experimentales que se encuentran en la literatura con respecto al valor nutritivo de esta proteína, los que en general fueron realizados sobre harina de semillas de lino utilizadas en alimentación animal. (3 - 8).

Por esta razón nos ha parecido de interés proceder al estudio nutricional de la proteína aislada de lino, máxime teniendo en cuenta que se trata de un cultivo muy extendido en nuestro país.

De acuerdo a ello en este trabajo hemos abordado su estudio experimental siguiendo las normas del Comité Asesor para Proteínas de FAO/OMS/UNICEF (PAG) (9) como pruebas preclínicas para nuevas fuentes proteínicas. Se determinó su valor nutritivo por los métodos de la Utilización Proteica Neta, la Relación de Eficiencia Proteica y el Número Químico. Además se realizaron ensayos de inocuidad en base al análisis de diferentes parámetros bioquímicos en ratas, y del peso y características histológicas de algunos de sus órganos, cuando ingirieron como única fuente de proteína la aislada del lino.

## PARTE EXPERIMENTAL

*Material*

El producto a analizar fue obtenido por Bertoni et al. a partir de semillas de lino (2) y se presentó como un polvo uniforme y liviano, blanco e insípido con un contenido de nitrógeno total de 12.3 %.

*Métodos*I.—*Determinación del Valor Nutritivo*

a) *Composición de la proteína:* Aminoácidos esenciales totales: Se utilizó el método microbiológico (10) y las cepas empleadas fueron: *Leuconostoc mesenteroides* ATCC - 8042 para lisina, leucina, isoleucina, metionina, cistina, fenilalanina y tirosina; *Streptococcus faecalis* ATCC - 8043 para valina y treonina; y *Lactobacillus plantarum* ATCC - 8014 para triptofano.

Lisina disponible: se determinó por el método de Carpen-ter modificado (11) (12).

b) *Utilización Proteica Neta:* (UPN<sub>10</sub>): Se utilizó el método de Miller y Bender (4), para el cual se emplearon 12 ratas de la cepa Wistar de alrededor de 60 g de peso y 32 días de edad al comienzo de la experiencia. Con ellas se formaron 3 lotes de los cuales 2 se alimentaron con la dieta problema y 1 con la dieta libre de proteínas. En la Tabla 1 se detalla la composición de las dietas como así también su contenido en proteínas, grasas y calorías, estas últimas se determinaron por bomba calorimétrica (13).

El valor de nitrógeno corporal para el cálculo de la UPN<sub>10</sub> fue obtenido por medio de la ecuación que representa la relación N/H<sub>2</sub>O (f). Edad que para nuestra colonia de ratas es la siguiente (14):

$$Y = 2.76 + 0.0293 X$$

donde: Y representa la relación N/H<sub>2</sub>O y X la edad en días.

Además, sobre un total de 5 ratas, 3 de las cuales pertenecían a los lotes problema y 2 al de la dieta libre de proteínas, se determinó el nitrógeno de las carcasas por el método de Kjeldahl (15). Los valores obtenidos, así como los respectivos contenidos de agua, se compararon con los correspondientes a ratas de la misma edad alimentadas con dieta stock.

*Cálculo de la UPN est.* : Se utilizó la siguiente fórmula:

$$UPN \text{ est} = \frac{UPN \text{ op} \times 54}{54 - P} - 8 \quad (16)$$

$$UPN_{op} = UPN_{10}$$

y  $P = \text{Calorías proteicas de la dieta } (\%)$

c) *Digestibilidad*: Se determinó simultáneamente con la  $UPN_{10}$  sobre un total de 6 animales. Para el cálculo se aplicó la fórmula:

$$D = \frac{I - (F - Fk)}{I} \quad (4)$$

donde: F y Fk es el contenido de nitrógeno de la materia fecal de las ratas con dieta en ensayo y libre de proteínas respectivamente; I es el valor de nitrógeno ingerido.

d) *Razón de Eficiencia Proteica (PER)*: Se determinó de acuerdo al método señalado por J. A. Campbell (17). Se utilizaron 20 ratas, 10 machos y 10 hembras, recién destetadas, a las que se agrupó en dos lotes, A y B, con un total de 5 machos y 5 hembras cada uno. Durante 4 semanas el lote A fue alimentado con la dieta problema y el lote B, control, con una dieta de caseína al 10%. La composición de las dietas aparece en la Tabla 1. Se registró el peso semanalmente y el consumo diariamente.

El valor del PER se obtuvo sobre el lote de machos, tanto en el lote problema como en el control. El valor que le correspondió a la proteína de lino fue corregido con respecto al de la caseína que a su vez fue llevado a 2.50.

## II.—*Ensayos toxicológicos*:

Al cabo de los 28 días que duró la determinación del PER se sacrificaron por punción cardíaca todos los animales, tanto machos como hembras del lote problema y del control a los que se les extrajo: la sangre y los órganos que luego se detallarán.

a) *Análisis hematológico*: Sobre sangre total se determinó: hematocrito y hemoglobina (18). Sobre el plasma: proteínas totales, por el método de A. Marenzi y col. (19) y seroalbúmina por electroforesis; urea por el método de V. Bohnstedt (20) y la actividad de la fosfatasa alcalina por el método de P. R. Kind y E. J. King (21). En todos los casos las determinaciones se realizaron sobre el pool de machos y hembras correspondientes a cada lote.

b) *Órganos*: Se registró el peso individual de los siguientes órganos: hígado, riñón, cerebro, timo, testículo u ovario, hipófisis y adrenales.

**TABLA N° 1**  
**COMPOSICION DE LAS DIETAS EMPLEADAS PARA LA DETERMINACION DEL VALOR NUTRITIVO DE LA PROTEINA AISLADA DE LA SEMILLA DE LINO**

	UPN		PER	
	Dieta experimental	Dieta libre de proteínas. g/100g.	Dieta experimental	Dieta control (casefna) g/100g.
Proteína aislada de lino (1)	13.00	-	13.00	-
Casefna (2)	-	-	-	13.00
Aceite de maíz	14.50	14.50	9.50	9.50
Mezcla de sales (3)	5.00	5.00	5.00	5.00
Vitaminas hidrosolubles (3)	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitaminas liposolubles (3)	0.50	0.50	0.50	0.50
Colina (4)	0.15	0.15	0.15	0.15
Dextrina c.s.p.	100.00	100.00	100.00	100.00
Contenido en proteínas (Nx6.25)	10.00	-	10.00	10.00
Contenido en grasa	15.00	15.00	10.00	10.00
Calorías proteicas	8.88	-	-	-
Calorías totales	453.00	-	-	-

- (1) Contiene 12.3% de N (76.9% de proteína)  
(2) Contiene 12.3% de N (76.9% de proteína)  
(3) Harper A. E. (30)  
(4) Como citrato de colina.

c) *Composición del hígado*: Sobre cada hígado se determinó el contenido de agua, grasa y proteína por los siguientes métodos:

Agua: por desecación en estufa a 100° hasta peso constante.

Grasa: por extracción con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1).

Proteína: por el método de Kjeldahl (15). El factor de conversión fue 6.25.

d) *Análisis histológicos*: Se cortaron porciones de hígado y riñón de cada uno de los animales y se los fijó durante 24 horas con el líquido de Bouin, con el agregado de ácido acético al 1% y bicloruro de mercurio al 1%. Luego de ser incluidas en Paraplast, las piezas fueron cortadas con un espesor de 7  $\mu$  y coloreadas con hematoxilina-eosina.

## RESULTADOS

En la Tabla 2 se señala la composición en aminoácidos esenciales del material en estudio. En la misma Tabla se incluyó también el valor de lisina disponible que resultó ser el 89% de la total.

En la Tabla 3 se agruparon los resultados obtenidos en la evaluación biológica de la proteína en estudio. Se puede observar que la  $UPN_{10}$  cuyo valor fue de 57.80 no resultó significativamente diferente al de la  $UPN_{est.}$  61.10 calculada a través del valor promedio para la  $UPN_{10}$  con un porcentaje de 8.88 calorías proteicas en la dieta.

El valor obtenido para el PER, 1.76, resultó inferior al de la caseína. El Número Químico (22), que surgió de la relación entre el contenido de lisina disponible y los requerimientos de este aminoácido para la rata en crecimiento de la cepa Wistar (23) fue de 56.5.

En la Tabla 4 se pueden observar el contenido en nitrógeno y agua corporal, como así también la relación  $N/H_2O$ , obtenidos por determinación directa sobre 3 animales del lote A y 2 del lote B. Estos controles se realizaron con el objeto de verificar la coincidencia de los valores de nitrógeno corporal calculados con los reales. Como se puede observar, los parámetros analizados en los animales de la experiencia responden a ratas normales de la misma edad de nuestra colonia, por lo tanto los valores obtenidos por cálculo fueron correctos.

**TABLA Nº 2**  
**CONTENIDO EN AMINOACIDOS ESENCIALES DE LA PROTEINA AISLADA DE LA SEMILLA DE LINO**

	g/16g N
Lisina total	4.11
Lisina disponible	3.67
Triptofano	1.30
Metionina	2.32
Cistina	1.46
Fenilalanina	4.47
Tirosina	2.39
Leucina	5.28
Isoleucina	6.09
Valina	4.95
Treonina	3.33

**TABLA Nº 3**  
**VALOR NUTRITIVO DE LA PROTEINA AISLADA DE LA SEMILLA DE LINO**

UPN <sub>10</sub>	57.80 ± 3.80 <sup>(1)</sup>
UPN <sub>est.</sub>	61.10 ± 4.50 <sup>(2)</sup>
PER	1.76 <sup>(3)</sup>
Digestibilidad	91.12 ± 4.00
Número Químico	56.50 <sup>(4)</sup>

(1) Media ± Desviación estandar de la media.

(2) Valor calculado con la media de la UPN<sub>10</sub> según la fórmula  $\frac{\text{UPN}}{\text{op x 54}} - 8$   
 54 - P

(3) Corregido para un valor de 2.50 para caseína.

(4) Número Químico (22) =  $\frac{\text{Contenido de lisina disponible \%}}{\text{Requerimiento de lisina para la rata en crecimiento}} = \frac{3.67 \times 100}{6.50}$  (22)

**TABLA N° 4**  
**NITROGENO CORPORAL Y RELACION N/H<sub>2</sub>O DE RATAS UTILIZADAS EN EL CALCULO DE LA UPN**

RATAS (42 días de edad)	Nitrógeno corporal		H <sub>2</sub> O corporal	N/H <sub>2</sub> O
	calculado g	(1) experimental g	g	
	<u>Dieta experimental</u>			
Rata N° 1	2.00	1.99	50.3	3.95
Rata N° 2	2.05	2.06	51.5	4.00
Rata N° 3	2.19	2.17	55.5	3.90
	<u>Dieta libre de proteínas</u>			
Rata N° 1	1.39	1.37	34.8	3.93
Rata N° 2	1.38	1.39	34.7	4.00
	<u>Dieta stock</u>			
	-	-	-	3.99 <sup>(2)</sup>

(1) Se calculó con la ecuación  $Y = 2.76 + 0.0293 x$ ; donde  $Y = \frac{N}{H_2O}$  y "x" edad de las ratas en días.

(2) Calculado para ratas de 42 días, a través de la ecuación anterior que fuera obtenida con animales de nuestra colonia.

**TABLA Nº 5**  
**RESULTADO DEL ANALISIS BIOQUIMICO DE LA SANGRE DE LOS ANIMALES, MACHOS Y HEMBRAS ALIMENTADOS CON LA DIETA EXPERIMENTAL Y LA DIETA CONTROL DE CASEINA (1)**

	Dieta control (caseína)		Dieta experimental	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Peso de las ratas	105.2 ± 13.4 <sup>(2)</sup>	96.44 ± 9.80	76.8 ± 9.40	73.14 ± 14.00
Hematocrito (%)	41	43	42	42
Hemoglobina (g/100 ml)	10.80	10.50	10.50	11.60
Proteínas plasmáticas (g/100 ml)	4.89	4.64	4.78	4.92
Albumina (g/100 ml)	2.60	2.50	2.55	2.54
Urea (g/1000 ml)	0.18	0.13	0.14	0.20
Fosfatasa alcalina (U.K.A.)	22.5	32.5	31.5	28.5

(1) Todas las determinaciones bioquímicas se efectuaron sobre pool de sangre de 5 animales por lote.

(2) Media ± Desviación estandar.

**TABLA Nº 6**  
**PESO DE ORGANOS Y COMPOSICION DEL HIGADO DE LOS LOTES DE RATAS MACHOS**  
**Y HEMBRAS ALIMENTADAS CON LA DIETA EXPERIMENTAL Y LA DIETA CONTROL**

	Dieta control (casefna)		Dieta experimental	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Peso de las ratas	105.2 ± 13.4 <sup>(1)</sup>	96.44 ± 9.80	76.82 ± 9.40	73.14 ± 14.00
<u>Peso de los órganos</u>				
Hígado (g/100 g rata)	4.10 ± 0.20	4.30 ± 0.22	3.54 ± 0.44 <sup>(2)</sup>	3.87 ± 0.32 <sup>(2)</sup>
Riñón "	0.46 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.44 ± 0.04
Cerebro "	1.16 ± 0.43	1.17 ± 0.11	1.53 ± 0.16	1.53 ± 0.25 <sup>(2)</sup>
Timo "	0.18 ± 0.02	0.25 ± 0.08	0.25 ± 0.03 <sup>(3)</sup>	0.19 ± 0.02
Bazo "	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.02 <sup>(3)</sup>	0.21 ± 0.03
Testículo/ Ovario (mg/100 g rata)	568.10 ± 67.00	17.90 ± 3.10	372.00 ± 141.00 <sup>(2)</sup>	12.00 ± 1.90 <sup>(2)</sup>
Hipófisis "	3.69 ± 0.30	4.50 ± 0.82	4.18 ± 0.46 <sup>(4)</sup>	3.23 ± 1.50
Suprarenal "	9.02 ± 0.04	11.13 ± 2.34	10.31 ± 1.46	11.45 ± 2.55
<u>Composición del hígado</u>				
H <sub>2</sub> O (g/100 g hígado)	74.26 ± 0.88	73.90 ± 1.18	71.46 ± 0.70 <sup>(3)</sup>	71.30 ± 0.58 <sup>(3)</sup>
Grasas "	6.50 ± 0.31	6.30 ± 0.54	8.70 ± 0.84 <sup>(3)</sup>	8.20 ± 1.04 <sup>(3)</sup>
Proteína "	15.21 ± 0.50	14.70 ± 0.48	15.82 ± 1.60	14.83 ± 1.44

(1) Media ± desviación estandar. La media corresponde en todos los casos a lotes de 5 animales.

(2) Diferencia significativa con respecto al lote control (P < 0.05).

(3) Diferencia muy significativa con respecto al lote control (P < 0.001).

(4) Diferencia significativa con respecto al lote control (P = 0.01).

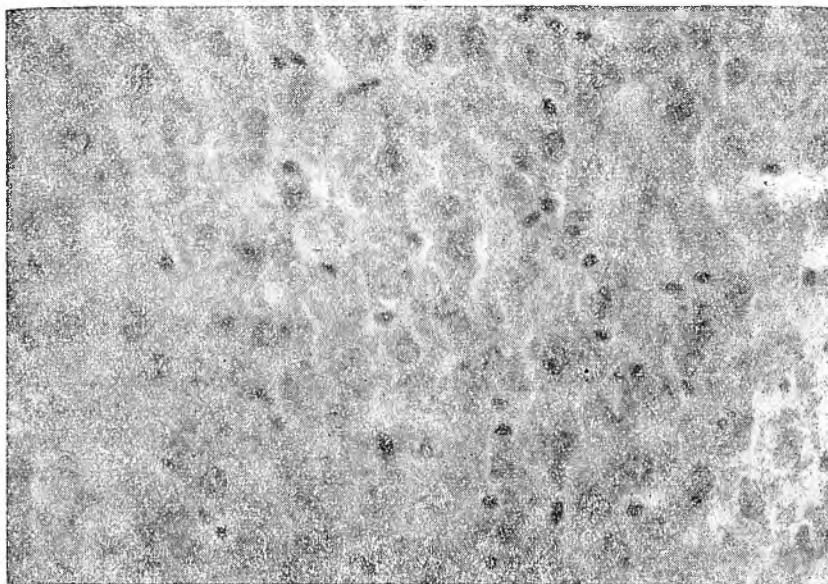


Figura N° 1.—Hígado, correspondiente al lote control de caseína.

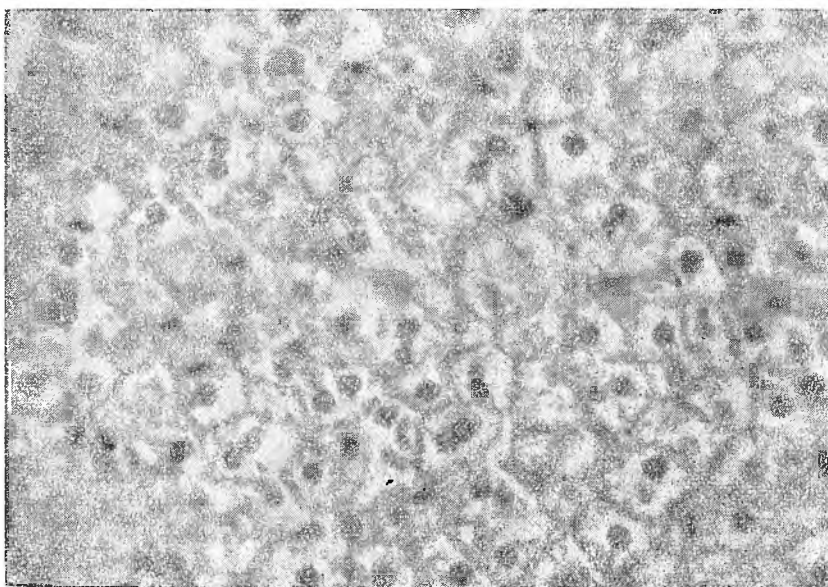


Figura N° 2.—Hígado, correspondiente al lote alimentado con la dieta experimental.

La Tabla 5 muestra los resultados de las determinaciones bioquímicas, realizadas sobre cada pool correspondiente a los machos y a las hembras de los lotes problema y control que se utilizaron para la determinación del PER, y que fueron: hematocrito, hemoglobina, proteínas plasmáticas totales, albúmina, urea y actividad de fosfatasa alcalina. Como se puede observar los valores obtenidos en los dos lotes fueron similares.

En la Tabla 6 aparecen el peso de los órganos y la composición del hígado de los animales alimentados con la dieta experimental y con la dieta de caseína. El peso del hígado, testículo u ovario en los animales a los que se les dió la dieta experimental, expresados por 100 g de rata, resultaron inferiores a los controles. Por el contrario, en el caso del cerebro y de la hipófisis mostraron mayor peso en las hembras y en los machos respectivamente, correspondientes a la dieta experimental. Para timo y bazo se registraron pesos mayores y menores, respectivamente, a los controles en el lote de machos.

En cuanto a la composición del hígado se puede observar que, si bien el contenido proteico fue similar con las dos dietas, los hígados de las ratas que fueron alimentadas con la dieta problema contenían más grasa y menos agua que los de las ratas controles, siendo la diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ).

En el análisis histológico se pudo observar lo siguiente: el hígado y riñón de los animales controles mostraron al microscopio óptico características normales, lo que se evidencia en la Fig. 1 que muestra los hepatocitos con el núcleo de densidad cromática normal y un citoplasma con escasas áreas de acumulación lipídica.

En los animales a los que se les dió la proteína aislada de la semilla de lino, los hepatocitos muestran signos de una ligera infiltración grasa. Como se observa en la Fig. 2, los núcleos celulares presentan una moderada picnosis y los nucleolos son de tamaño algo menor. A nivel del citoplasma, la infiltración grasa se evidencia por las grandes zonas ausentes de estructuras, que no se han coloreado con la eosina. Es de señalar que el riñón de estos animales no presentó modificaciones estructurales con respecto a los controles.

## DISCUSION

El análisis del contenido en aminoácidos esenciales de la proteína aislada de la semilla de lino, demostró una equilibrada composición, limitada en su valor biológico por su contenido en lisina. Si tenemos en cuenta los requerimientos de ese aminoácido para la rata en crecimiento de la cepa Wistar (23), el Número Químico resulta igual a 56.5 que indica un valor nutritivo similar al obtenido en el ensayo de la UPN.

Estos valores resultaron más elevados que los determinados por otros autores como Miller y Bender (4) y Chalupa y Fischer (5) que obtuvieron para la harina de lino una UPN de 55.0 y 44.8 respectivamente con una digestibilidad de 80.4 en el último caso.

De lo observado anteriormente, aún descartando el hecho de que los valores que obtuvimos fueron más altos debido a una mayor digestibilidad podríamos inferir que el proceso de aislamiento no dañó a la proteína de la harina. Sin embargo, para comprobarlo serían necesarios ensayos comparativos de harina de lino y proteína aislada de la misma procedencia.

Además, es de notar que la composición corporal al cabo de 10 días de experiencia fue la que corresponde a animales normales para la misma edad. Esta observación confirma la característica ya mencionada de la composición de la proteína en lo que se refiere al equilibrio de los aminoácidos esenciales (24), aún cuando el contenido de algunos de ellos, especialmente lisina y luego los aminoácidos azufrados, treonina y leucina, no alcanzan niveles óptimos cuando se los compara con los requerimientos para la rata en crecimiento (23).

El valor de la Razón de Eficiencia Proteica resultó aparentemente inferior al obtenido por K. Henry (6) que fue de 2.11 sin corregir con respecto a su control de caseína (3.57). Si se realiza dicha corrección, la Razón de Eficiencia Proteica para la harina de lino pasa a ser 1.47, valor inferior al obtenido en este trabajo para la proteína aislada.

El peso de los órganos reflejó la diferente calidad biológica de la proteína en ensayo con respecto a la caseína: especialmente en el hígado, bazo, testículo y ovario. En el caso de los órganos sexuales fue marcada la inmadurez que presentaron los animales alimentados con la dieta de lino. Por el contrario el peso del cerebro y la hipófisis resultaron superiores a los

controles. Esto confirmaría lo ya establecido por otros autores (25), de que dichos órganos no son afectados por la calidad de la proteína cuando es ingerida después de la lactancia.

La composición del hígado en ambos lotes resultó diferente, en lo que se refiere al contenido de grasa. La mayor concentración de grasa que se encuentra en los hígados del lote experimental y que también se hizo evidente en la observación histológica, podría estar relacionada al bajo contenido en metionina (26), lisina (27) y treonina (28) de la proteína en estudio.

Sin embargo, dicha concentración no se manifiesta con síntomas de mal funcionamiento, por lo menos en los parámetros bioquímicos analizados al término de la experiencia.

El análisis histológico de riñón, demostró una estructura normal del tejido renal en los animales alimentados con la proteína en estudio, lo cual permitiría descartar la posibilidad de incidencia de cálculos renales observados por otros autores con proteínas tratadas con soluciones alcalinas (29).

De todo lo anteriormente observado surge la evidencia que la proteína extraída de la semilla de lino según la técnica de Bertoni y Cattáneo (2) está desprovista de efectos tóxicos agudos, no presenta signos de toxicidad en las condiciones analizadas, es decir, en experiencias de 4 semanas.

Sin embargo, para poder preconizar su uso en la alimentación humana habría que realizar ensayos de larga duración como lo ha señalado el Comité Asesor sobre Proteínas (9).

## AGRADECIMIENTO

Se agradece al Dr. David Zambrano, Profesor de Histología Humana de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, la realización del estudio histológico.

## SUMMARY

**Isolated protein from Linseed meal. I. Nutritive value and toxicological tests**

Isolated linseed protein (*Linum usitatissimum* L.) was analyzed as a new source of edible protein.

Tests concerning nutritive value were: essential amino acid composition, net protein utilization, protein efficiency ratio and chemical score.

Toxicological tests were performed with rats of both sexes which have been fed on test protein and casein as control, during 28 days. Criteria used

in these tests were: hematological data and blood chemistry, organ weights, liver composition and histopathology.

Our results indicate that nutritive value was lower than that of casein being lysine the first limiting amino acid. Sulfur amino acids, threonine and leucine were also in suboptimal quantities.

The tests about toxicity showed no signs of pathological damage, except a light fat liver infiltration; nevertheless long time assays must be done to assure complete safety.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Anson M. L. "Processed Plant Protein Foodstuffs" A. M. Altschul. Academic Press Inc. Publishers, N. York. p. 277-289, 1958.
2. Bertoni M. H. y P. Cattáneo "Aislamiento de proteínas de harina integral de semillas de lino" *Anales Asoc. Quím. Argentina*; 60: 363-374, 1972.
3. Braman, W. W. "The relative values of the protein of linseed and cottonseed in the nutrition of growing rats". *J. Nutr.* 4, 249-259, 1931.
4. Miller, D. S. and A. E. Bender. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. *Brit. J. Nutr.*, 9: 382-388, 1955.
5. Chalupa, W. and H. Fischer. "Comparative protein evaluation studies by carcass retention and nitrogen balance methods". *J. Nutr.* 81: 139-146, 1963.
6. Henry, K. M. "A comparison of biological methods with rats for determining the nutritive value of proteins". *Brit. J. Nutr.* 19: 125-135, 1965.
7. Salem, H. M. and M. Bkhert. "Biochemical studies on linseed proteins" *Alexandria J. Agric. Res.* 12, N° 2, 11-112, 1964. Tomado de *Nutrition Abstracts and Reviews, Abs.* 36, N° 1, N° 352, 1966.
8. C. H. van Etten, W. F. Kwolek, J. E. Peters and A. S. Barclay. "Plant seeds as protein sources for food or feed evaluation based on amino acid composition of 379 species". *J. Agric. Food Chem.* 15: 1077-1089, 1967.
9. FAO/WHO/UNICEF. Protein Advisory Group. "Guideline for pre-chemical testing of novel sources of proteins". *PAG. United Nations, N. York U. S. A. Guideline* N° 6, 1971.
10. Basualdo, R., P. Carrera y J. C. Sanahuja. "Determinación de aminoácidos y vitaminas hidrosolubles en harinas de girasol por métodos microbiológicos. Influencia del proceso tecnológico sobre su contenido". *Rev. Asoc. Bioq. Arg.* XXXVI (192-193) 1-9, 1971.
11. Carpenter, M. J. The estimation of the available lysine in animal protein foods. *Biochem. J.*: 604-610, 1960.
12. Raghavendar Rao, S., F. L. Carter and U. I. Frampton. Determination of available lysine in oilseed meal protein. *Anal. Chem.* 35: 1927-1930, 1963.
13. Miller, D. S. y P. R. Payne. "A ballistic bomb calorimeter" *Brit. J. Nutr.* 13: 501-508, 1959.
14. Sambucetti, M. E. y J. C. Sanahuja. El valor nutritivo de las harinas de pescado y su relación con el contenido en lisina y metionina disponibles. *Arch. Latinoamer. Nutr.*; 20: 119-133, 1970.

15. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 9th. Ed. p. 286, 1960.
16. Evaluation of protein quality. Publication 1.100. National Academy of Sciences, National Research Council, pag. 35. Washington 1963.
17. Evaluation of protein quality. Publication 1.100. National Academy of Sciences, National Research Council, pag. 19, Washington 1963.
18. Dacie, J. D., Lewis, S. M. Hematología práctica. Toray Ed. pág. 42, 1965.
19. Marenzi, A., J. Moglia y F. Vilallonga. Estudio comparativo de algunos métodos de valoración de las proteínas del suero. I. Proteínas totales. *An. Cent. Invest. Tis.*, 9: 133-143, 1945.
20. Bohnstedt, V. Die Verwendung der Indophenolblau Reaktion zur photometrischen Stickstoffbestimmung. *Z. Analyt. Chem.*, 163: 415-421, 1958.
21. Kind, P. R. and E. J. King. Estimation of plasma phosphatase by determination of hidrolized phenol with amino-antipyrine. *J. Clin. Path.*, 7: 322-326, 1954.
22. Mitchell, H. H. and R. J. Block. Some relationships between the amino acid content of proteins and their nutritive values for the rat. *J. Biol. Chem.*; 163: 599-620, 1946.
23. Sambucetti, M. E. Evaluación de la calidad de las proteínas alimenticias. Tesis, pág. 116-117. Buenos Aires, 1971.
24. Río, M. E., S. J. Closa and J. C. Sanahuja. Changes in body composition in rats fed imbalanced diets. *J. Nutr.* 100: 69-77, 1969.
25. Guthrie, H. A. and M. L. Brown. Effect of severe undernutrition in early life on growth, brain size and composition in adult rats. *J. Nutr.* 94: 419-426, 1968.
26. Harper, A. H. "Review of physiological chemistry". Lange Medical Publications. Los Altos. California. 11th Ed. pág. 270-271, 1967.
27. Sanahuja, J. C., M. E. Río y M. N. Lede. "Effect of amino acid imbalance on nutritive value of supplemented proteins". *Fed. Proc.* 23, 879, 1964 (Abs. 37).
28. Sanahuja, J. C., M. E. Río y M. N. Lede "Decrease in appetite and biochemical Changes in amino acid imbalance in the rat" *J. Nutr.* 86, 424-432, 1965.
29. Gioot, A. P. and P. Slump. Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value. *J. Nutr.* 98: 45-46, 1969.
30. Harper, A. E. Amino acid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.* 68: 405-411, 1959.