

DETERMINACION DE LA DIGESTIBILIDAD PROTEINICA IN VITRO E IN VIVO EN CEREALES Y LEGUMINOSAS, CRUDOS Y COCIDOS

Miguel Hernández¹, Adolfo de la Vega² y Angela Sotelo³

Unidad de Investigación Biomédica, Instituto Mexicano del Seguro Social,
y Departamento de Posgrado, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Se determinó la digestibilidad de algunos cereales y leguminosas empleando dos métodos *in vitro*, y se comparó con la técnica *in vivo*, en ratas. Se utilizaron cuatro leguminosas (guisante, frijol negro, frijol blanco, y frijol ayocote) y tres cereales (maíz, arroz y trigo), crudos y cocidos. A tres de las leguminosas (frijoles) se les adicionó 0.6% de DL-metionina antes de su cocimiento. La digestibilidad *in vitro* de las muestras difirió según el método utilizado. El trigo y los guisantes, tanto crudos como cocidos, acusaron la mayor digestibilidad tanto *in vitro* como *in vivo*; la adición de metionina a los frijoles no modificó su digestibilidad *in vivo*. De los métodos *in vitro* utilizados, el procedimiento de Akeson y Stahmann mostró correlación directa con el método *in vivo* ($r = 0.874$; $P < 0.01$).

INTRODUCCION

La digestibilidad de las proteínas se considera como un indicador de su calidad. Así, por ejemplo, se sabe que los alimentos de origen animal son de mayor digestibilidad que los de origen vegetal (1, 2). Esto se ha atribuido al menor contenido de fibra cruda de los alimentos de origen animal, lo que hace que la velocidad de tránsito por el intestino sea más lenta y, en consecuencia, se obtenga una mayor absorción de nutrientes (3). Además,

Manuscrito modificado recibido: 11-5-84.

- 1 Investigador Asociado C, de la Sección de Bromatología, División de Nutrición, Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional (CMN), Instituto Mexicano del Seguro Social, México D. F., México.
- 2 Profesor de tiempo completo, ENEP-Zaragoza, Universidad Nacional de México.
- 3 Jefe de la Sección de Bromatología, División de Nutrición, Unidad de Investigación Biomédica, CMN, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 73-032, 03020 México D. F., México.

la estructura terciaria de las proteínas animales es menos compleja que la de los vegetales, por lo que es más fácilmente digerida por las enzimas intestinales (1). Otros factores que disminuyen la digestibilidad proteínica de los alimentos de origen vegetal son algunos elementos tóxicos, tales como los inhibidores de proteasas, taninos y hemaglutininas (4-7). De ahí la necesidad de emplear procesos térmicos drásticos para su cocción, que afecten la disponibilidad de los aminoácidos, ya que éstos pueden interactuar con los carbohidratos que abundan más en los alimentos de origen vegetal (4, 8).

Si bien idealmente la digestibilidad proteínica de los alimentos debiese ser medida en animales de experimentación, con miras a reducir el tiempo y los costos de esta determinación, se ha tratado de establecer procedimientos *in vitro* capaces de sustituir la técnica *in vivo*; ello explica la abundancia de técnicas propuestas para esta determinación (9-12).

En el presente trabajo se determinó la digestibilidad *in vivo* de algunos alimentos de origen vegetal, crudos y cocidos, comparándola con los resultados obtenidos con dos métodos *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Para este estudio se utilizaron arroz, maíz, trigo, frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) guisante seco (*Pisum sativum*), frijol negro y frijol blanco (*Phaseolus vulgaris*), todos ellos adquiridos en un mercado local de la ciudad de México.

Los cereales y el guisante se utilizaron crudos y cocidos en agua (relación líquido-sólido de 3:1) a ebullición durante tres horas, reponiéndose el agua perdida por evaporación. Al final de la cocción se eliminó el caldo por medio de un colador casero, y el grano se secó en un horno a 60-70°C durante 20 horas. Luego, las muestras crudas y cocidas se pasaron en un molino de laboratorio Arthur Thomas Co., hasta pasar un tamiz, malla No. 20, y en esta forma se utilizaron para el análisis y la preparación de las dietas.

Los frijoles se estudiaron en las condiciones siguientes:

- 1) Un lote se utilizó crudo.
- 2) Otro se sometió a cocción en forma idéntica a como se hizo con los cereales y el guisante, y luego secado, una vez eliminada el agua de cocción.
- 3) El tercer lote fue cocido en igual forma, pero incluyendo el agua de cocción.
- 4) El cuarto lote fue tratado en forma similar al segundo, pero antes de la cocción se agregó a los frijoles 0.6% de DL-metionina.
- 5) El último lote se cñó a un tratamiento similar al tercero, pero también se le adicionó metionina al 0.6%.

Los lotes de frijoles fueron secados y molidos, empleando la harina que pasó por el tamiz, malla No. 20.

Métodos

En todas las muestras se determinó el contenido de humedad y proteína según las técnicas descritas por la AOAC (10). La digestibilidad *in vitro* se midió de acuerdo a los métodos descritos por Akeson y Stahmann (12) y por Saunders y colaboradores (9), los cuales se exponen en forma resumida en la Figura 1.

Método de Saunders <i>et al.</i> (9)		Método de Akeson y Stahmann (12)	
Muestra, 250 mg		Muestra, 100 mg (proteína)	
HCl 0.1N 15 ml con 1.5 mg de pepsina		HCl 0.1N, 15 ml con 1.5 mg de pepsina	
Agítese a 37°C por 3 horas		Incúbese a 37°C por 3 horas	
Neutralícese con NaOH 0.5N		Neutralícese con 2.7 ml de NaOH 0.2N	
Pancreatina, 4 mg en 7.5 ml de buffer de fosfatos 0.02M, pH 8.0		Pancreatina, 4 mg en 7.5 ml de buffer de fosfatos pH 8.0	
Agítese 24 horas a 37°C		Incúbese 24 horas a 37°C	
Centrifúguese 5 min a 20,000 x g		Adiciónese ácido pícrico al 10/o	
Líquido	Sólido	Centrifúguese 30 min, a 100 x g	
	Lavado	Líquido	Sólido
	Determinación de nitrógeno	Análisis de nitrógeno	

FIGURA 1

Procedimientos para determinar la digestibilidad *in vitro*

Para el estudio de digestibilidad *in vivo* se elaboraron dietas con 100/o de proteína para los frijoles, y de 6-80/o para los cereales, manteniéndose constante el nivel energético (1.73 MJ 414 KCal) en todas ellas. La formulación utilizada se presenta en la Tabla 1. Las dietas se administraron a seis ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, recién destetadas de 21 a 23 días, y con un peso promedio inicial de 50 g. Los animales se mantuvieron en un período de adaptación de dos semanas, determinándose la digestibilidad proteínica aparente durante la tercera semana de estar ingiriendo las dietas. Durante esta última se pesó el alimento ingerido dos

TABLA 1

COMPOSICION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

Muestra	g	Almidón ¹ (g)	Aceite de maíz (g)	Mezcla de vitaminas ² (g)	Sales mine- rales ³	Celu- losa ⁴
Trigo crudo y cocido	58.8	23.2	12.9	2.0	3.1	—
Arroz crudo y cocido	86.4		8.0	2.0	3.6	—
Maíz crudo y cocido	70.0	14.4	10.9	2.0	2.7	—
Guisante crudo y cocido	46.0	35.7	13.3	2.0	3.0	—
Frijol negro cocido y crudo	42.4	39.4	13.1	2.0	2.1	1.0
Frijol ayocote coci- do y crudo	51.4	32.8	12.8	2.0	1.0	—
Alubia cocida y cruda	42.8	36.7	13.3	2.0	2.5	2.7

1 Productos de Maíz, S. A., México, D. F.

2 Nutritional Biochemicals, Cleveland, Ohio, EUA.

3 Rogers y Harper.

4 Celulosa tipo fibra, Teklad test diets, Wisconsin, Wisconsin, EUA.

veces, y al término de ella, se recolectaron las heces. Estas últimas fueron deshidratadas a 60-70°C durante 20 horas; luego se molieron hasta pasar la malla No. 20, y se determinó el contenido de nitrógeno. La fórmula para calcular la digestibilidad proteínica aparente fue la siguiente:

$$D = \frac{\text{Nitrógeno ingerido} - \text{Nitrógeno fecal}}{\text{Nitrógeno ingerido}} \times 100$$

Se determinó el coeficiente de correlación entre los métodos químicos y entre éstos y el procedimiento *in vivo* (13).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 2 se da a conocer el contenido de proteína y humedad del material estudiado. De los cereales, el trigo fue el que tuvo la mayor concentración de proteína (11.90/o). En los tres cereales se encontró un contenido proteínico ligeramente mayor en los lotes cocidos y secos, probablemente a causa de su menor contenido de humedad. En las leguminosas, el por ciento de proteína varió de 18.8 a 26.00/o, valores que concuerdan con los informados en la literatura para diferentes leguminosas (14).

Los resultados de la digestibilidad *in vitro* se detallan en la Tabla 3, encontrándose en general valores más elevados (excepto en las muestras crudas) al medir la digestibilidad según el método de Akeson y Stahmann

TABLA 2

CONTENIDO DE PROTEINA DE LOS MATERIALES ESTUDIADOS
(N x 6.25)

Material	g/100 g muestra	o/o humedad
Trigo crudo	11.9	14.0
Trigo cocido,secado sin líquido de cocción	12.9	5.2
Arroz crudo	8.1	12.0
Arroz cocido,secado sin líquido de cocción	10.6	6.0
Maíz crudo	7.8	11.0
Maíz cocido,secado sin líquido de cocción	8.5	6.5
Guisante crudo	21.7	9.5
Guisante cocido,secado sin líquido de cocción	23.7	4.5
Frijol negro crudo	22.9	12.9
Frijol negro cocido,secado con líquido de cocción	23.8	5.4
Frijol negro cocido,secado sin líquido de cocción	26.0	4.2
Frijol negro cocido con metionina,secado con líquido de cocción	22.0	6.2
Frijol negro cocido con metionina,secado sin líquido de cocción	22.8	5.8
Frijol ayocote crudo	18.8	8.5
Frijol ayocote cocido,secado con líquido de cocción	20.0	3.3
Frijol ayocote cocido,secado sin líquido de cocción	20.8	3.3
Frijol ayocote cocido con metionina,secado con líquido de cocción	18.8	4.0
Frijol ayocote cocido con metionina,secado sin líquido de cocción	19.1	5.4
Frijol blanco crudo	23.5	9.3
Frijol blanco cocido,secado con líquido de cocción	24.0	2.0
Frijol blanco cocido,secado sin líquido de cocción	23.4	2.7
Frijol blanco cocido con metionina,secado con líquido de cocción	23.0	3.9
Frijol blanco cocido con metionina,secado sin líquido de cocción	23.0	2.3

(12). No se constató correlación entre los dos procedimientos empleados, ya que con el método de Saunders *et al.* (9), todas las muestras crudas exhibieron valores de digestibilidad aparentemente superiores que las cocidas, en tanto que con el de Akesson y Stahmann, ocurrió a la inversa. Podría ser que la razón radique en los inhibidores de tripsina, al interferir con la hidrólisis de la proteína y su solubilización.

La digestibilidad proteínica aparente y sus consiguientes resultados se consignan en la Tabla 4. Debido al diferente porcentaje de nitrógeno en la dieta, su ingesta varió, siendo mayor en las leguminosas que en los cereales. Con estos últimos se registró una menor pérdida de nitrógeno por las heces, probablemente como efecto compensatorio a la menor ingesta

TABLA 3

DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE ALGUNOS CEREALES Y LEGUMINOSAS, CRUDOS Y COCIDOS (°/o)

Muestras	Métodos <i>in vitro</i>	
	Akeson y Stahmann (12)	Saunders <i>et al.</i> (9)
Trigo crudo	93.0	82.2
Trigo cocido, secado sin líquido de cocción	95.7	75.7
Arroz crudo	88.6	68.5
Arroz cocido, secado sin líquido de cocción	72.9	65.9
Maíz crudo	91.5	70.0
Maíz cocido, secado sin líquido de cocción	82.7	53.2
Guisante crudo	100.0	84.4
Guisante cocido, secado sin líquido de cocción	91.7	84.2
Frijol negro crudo	55.9	83.9
Frijol negro cocido, secado con líquido de cocción	77.4	58.4
Frijol negro cocido, secado sin líquido de cocción	76.0	67.1
Frijol negro cocido con metionina, secado con líquido de cocción	84.9	62.0
Frijol negro cocido con metionina, secado sin líquido de cocción	79.4	68.6
Frijol ayocote crudo	57.3	78.7
Frijol ayocote cocido, secado con líquido de cocción	77.0	55.2
Frijol ayocote cocido, secado sin líquido de cocción	82.9	61.6
Frijol ayocote cocido con metionina, secado con líquido de cocción	92.3	62.4
Frijol ayocote cocido con metionina, secado sin líquido de cocción	93.7	50.4
Frijol blanco crudo	50.9	76.2
Frijol blanco cocido, secado con líquido de cocción	86.8	64.3
Frijol blanco cocido, secado sin líquido de cocción	86.6	61.5
Frijol blanco cocido con metionina, secado con líquido de cocción	84.8	70.4
Frijol blanco cocido con metionina, secado sin líquido de cocción	85.0	68.6

de nitrógeno. En los cereales la digestibilidad fue similar en las muestras crudas y las cocidas, excepto en el caso del arroz en el que, en forma cocida, exhibió una menor digestibilidad, tal vez porque durante la cocción se obtuvo un caldo muy espeso. En efecto, se utilizó arroz blanco, por lo que hubo retrogradación del almidón y fue muy difícil separar el agua de cocción del grano en el proceso de secado. Ello tuvo como consecuencia el alargamiento del grano, lo que puede causar compuestos no hidrolizables por las enzimas gastrointestinales. Esto último también parece ser válido para los frijoles que se secaron con el agua de cocción, ya que en éstos se encontró una menor digestibilidad en comparación con los frijoles

TABLA 4

**DATOS DEL ESTUDIO BIOLÓGICO Y DIGESTIBILIDAD PROTEÍNICAS
APARENTE EN CEREALES Y LEGUMINOSAS***

Material	Nitrógeno ingerido (g)	Nitrógeno fecal (g)	o/o de nitrógeno en dieta (g)	Digestibi- lidad (g)
Trigo crudo	0.632	0.122	1.28	80.6 ± 3.1
Trigo cocido, secado sin líquido de cocción	0.691	0.133	1.36	77.1 ± 2.5
Arroz crudo	0.685	0.092	1.15	86.6 ± 0.7
Arroz cocido, secado sin líquido de cocción	0.755	0.242	1.23	67.6 ± 3.1
Maíz crudo	0.398	0.082	0.83	79.3 ± 2.6
Maíz cocido, secado sin líquido de cocción	0.394	0.076	0.96	80.7 ± 4.0
Guisante crudo	0.821	0.156	1.67	79.3 ± 2.6
Guisante cocido, secado sin líquido de cocción	0.964	0.176	1.81	80.7 ± 4.0
Frijol negro cocido, secado con líquido de cocción	0.723	0.268	1.55	62.8 ± 5.0
Frijol negro cocido, secado sin líquido de cocción	0.760	0.247	1.50	67.3 ± 3.1
Frijol negro cocido con metionina, secado con líquido de cocción	1.044	0.347	1.62	62.3 ± 2.0
Frijol negro cocido con metionina, secado sin líquido de cocción	1.081	0.393	1.60	61.7 ± 4.7
Frijol ayocote cocido, secado con líquido de cocción	0.771	0.329	1.59	57.1 ± 3.0
Frijol ayocote cocido, secado sin líquido de cocción	0.710	0.276	1.47	59.7 ± 4.6
Frijol ayocote cocido con metionina, secado con líquido de cocción	0.988	0.433	1.57	56.0 ± 3.5
Frijol ayocote cocido con metionina, secado sin líquido de cocción	1.078	0.420	1.60	61.3 ± 4.0
Frijol blanco cocido, secado con líquido de cocción	0.642	0.143	1.69	77.0 ± 3.5
Frijol blanco cocido, secado sin líquido de cocción	0.793	0.180	1.66	77.1 ± 2.5
Frijol blanco cocido con metionina, secado con líquido de cocción	0.880	0.206	1.64	76.4 ± 3.5
Frijol blanco cocido con metionina, secado sin líquido de cocción	0.932	0.207	1.66	77.7 ± 2.3

* En los frijoles crudos no se determinó la digestibilidad porque los animales murieron en menos de 15 días.

secados, después de haber decantado el agua.

El frijol negro (con aproximadamente 58^o/o) y el frijol ayocote (con 63^o/o) resultaron ser las muestras de menor digestibilidad, mientras que el guisante (80^o/o) mostró una digestibilidad similar a la de los cereales.

En el caso del frijol crudo no se pudo determinar su digestibilidad, ya que las ratas que lo ingirieron murieron en su totalidad en menos de dos semanas, por efecto de las sustancias tóxicas que contiene (15, 16). La adición de metionina no modificó su digestibilidad, a pesar de que el agregado de este aminoácido sí mejora el valor nutritivo de la proteína de las leguminosas (17, 18).

TABLA 5

COEFICIENTES DE CORRELACION DE DIGESTIBILIDAD ENTRE LOS
METODOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

$$(y = a + bx)$$

Método de Akeson y Stahmann (12), vs método de Saunders *et al.* (9)

$$\begin{aligned} a &= 77.590 \\ b &= -0.112 \\ r &= -0.144 \end{aligned}$$

Método de Akeson y Stahmann, vs método *in vivo*

$$\begin{aligned} a &= -84.800 \\ b &= 1.792 \\ r &= 0.874 \end{aligned}$$

Método *in vivo*, vs método de Saunders *et al.*

$$\begin{aligned} a &= 74.116 \\ b &= -0.092 \\ r &= -0.241 \end{aligned}$$

En la Tabla 5 se aprecian los coeficientes de correlación entre los métodos *in vitro*, y entre éstos y la digestibilidad *in vivo*, encontrándose que entre las técnicas *in vitro* no hubo correlación; de ellos, el método de Akeson y Stahmann fue el que correlacionó con la digestibilidad *in vivo* ($r = 0.874$; $P < 0.01$). Sin embargo, el procedimiento *in vitro* dio valores más elevados que el método *in vivo*, lo que da lugar a la posibilidad de mejorar esta correlación, o bien de encontrar otro método *in vitro* que muestre valores similares a la digestibilidad *in vivo*.

SUMMARY

**IN VITRO AND IN VIVO PROTEIN DIGESTIBILITY DETERMINATIONS
OF RAW AND COOKED CEREALS AND LEGUMES**

The digestibility of some cereals and legumes was determined in rats by two *in vitro* methods, and compared with the *in vivo* technique. Four raw and cooked legumes (peas, black beans, white beans and "ayocote" beans) and three cereals (corn, rice and wheat) were used for this purpose. Prior to cooking, 0.6% DL-methionine was added to three of the legumes. The *in vitro* digestibility of the samples differed according to the applied methodology. Wheat and peas, both raw and cooked, showed the greatest *in vitro* and *in vivo* digestibility; methionine addition to the beans did not modify their *in vivo* digestibility. Of the *in vitro* methods used, the Akesson and Stahmann procedure showed a direct correlation with the *in vivo* method ($r = 0.874$; $P < 0.01$).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Silvestre Frenk por su valiosa ayuda en la preparación del manuscrito, y a la Sra. Rosa María Hernández Arellano por el trabajo secretarial. Este estudio, cabe agregar, fue patrocinado en parte por la Organización de Estados Americanos (OEA).

BIBLIOGRAFIA

1. Bressani, R., L. G. Elías & M. R. Molina. Estudios sobre la digestibilidad de las proteínas de varias especies de leguminosas. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 27:215-231, 1977.
2. Marshall Jr., H. F., G. W. Wallace & L. D. Satterlee. Prediction of protein digestibility by an *in vitro* procedure using human, porcine and rat pancreatin preparations. *Nutr. Repts. Internat.*, 19:901-913, 1979.
3. De Souza, N. & M. H. Bicuda. Digestibilidade da proteína do feijão. En: *Coloquio sobre Valor Nutricional de las Leguminosas de Grano y Factores que Afectan su Producción, Disponibilidad y Consumo*. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 27(2): 69-77, 1977 (Suplemento No. 2).
4. Sikka, K. C., A. K. Gupta, R. Singh & D. P. Gupta. Comparative nutritive value, amino acid content, chemical composition and digestibility *in vitro* of vegetable and grain-type soybeans. *J. Agr. Food Chem.*, 26:312-316, 1978.
5. Romero, J. & D. Ryan. Susceptibility of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris*, to *in vitro* enzymatic hydrolysis. *J. Agr. Food Chem.*, 26: 784-788, 1978.
6. Ramachandra, G., T. K. Virupaksha & M. Shadaksharaswamy. Relationship between tannin levels and *in vitro* protein digestibility in finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn.). *J. Agr. Food Chem.*, 25:1101-1104, 1977.
7. Bond, D. A. *In vitro* digestibility of the testa in tannin-free field beans (*Vicia faba*, L.). *J. Agr. Sci. Camb.*, 86:561-566, 1976.
8. Bidwood, E. J. Availability of amino acids in foods. In: *International Encyclopaedia of Food and Nutrition*. Vol. II: Protein and Amino Acid Functions.

- Oxford, England, Pergamon Press, Ltd., 1972.
9. Saunders, R. M., M. A. Connor, A. N. Booth, E. M. Bickoff & G. O. Kohler. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. *J. Nutr.*, **103**:530-535, 1973.
 10. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC.** W. Horwitz (Ed.). 11th ed. Washington, D. C., The Association, 1970.
 11. Hsu, H. W., D. L. Vavak, L. D. Satterdee & G. A. Miller. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.*, **42**:1269-1273, 1979.
 12. Akesson, W. R. & M. A. Stahmann. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.*, **83**:257-261, 1964.
 13. Steel, R. G. D. & J. H. Torrie. **Principles and Procedures of Statistics.** New York, N. Y., Mc Graw-Hill, 1960.
 14. Liener, I. E. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am. J. Clin. Nutr.*, **11**:281-299, 1972.
 15. Pak, N., A. Mateluna & H. Araya. Efecto de diversos tratamientos térmicos en el contenido de hemaglutininas y en la calidad proteica del frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **28**:184-195, 1978.
 16. Jaffé, W. G. Factores tóxicos en leguminosas. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **18**:203-218, 1968.
 17. Braham, J. E., R. M. Vela, R. Bressani & R. Jarquín. Efecto de la cocción y de la suplementación con aminoácidos sobre el valor nutritivo de la proteína del gandul (*Cajanus indicus*). *Arch. Venezol. Nutr.*, **15**:19-32, 1965.
 18. Bressani, R., L. G. Elías & A. T. Valiente. Effect of cooking and amino acid supplementation on the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Brit. J. Nutr.*, **17**:69-78, 1963.