

## **International Master (MSc) in Animal Nutrition**

IX Edition

### **ALTERNATIVAS AL PROTOCOLO DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE REFERENCIA (BOISEN & FERNANDEZ 1997) PARA ESTIMACION DE LA DIGESTIBILIDAD ILEAL EN LECHONES AL DESTETE.**

Por:

**Ing. Agr. Alejandro Acosta Lagaxio**

Bajo supervisión de:

**Dr. José Francisco Pérez Hernández**

**Junio, 2025**

*"Todos los animales son iguales, pero  
algunos son más iguales que otros"*

*Animal Farm  
George Orwell 1945*

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi más sincero agradecimiento al **Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)** y a su estimado director, el **Sr. Raúl COMPÉS**, por brindarme la oportunidad de participar en este programa de máster. Igualmente, extiendo mi gratitud al Dr. **Andrés SCHLAGETER**, nuestro coordinador del máster, por su dedicación y apoyo a lo largo de todo el programa.

A la **Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (UNIZAR)** y a su ilustre Cátedra de Nutrición Animal, representada por el **Profesor Manuel FONDEVILA CAMPS**, por su constante compromiso con la educación.

Quiero hacer un reconocimiento especial al **Servicio de Nutrición y Bienestar Animal (SNiBA)** de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). En particular, agradezco profundamente a mi tutor, Catedrático **Dr. José Francisco PÉREZ HERNÁNDEZ**, por la cálida acogida y por brindarme los recursos y el apoyo necesario para llevar a cabo mi tesis. Agradezco especialmente que en ningún momento haya limitado mi desarrollo, velando siempre por mi crecimiento profesional y ofreciéndome un apoyo moral incondicional.

Deseo reconocer también la inestimable colaboración del excepcional **equipo de laboratorio, especialmente a Esther ALÒS GARCÍA**. Además, agradezco a mis **compañeros del SNiBA y G2R (UAB)**, quienes generosamente me ofrecieron su ayuda y soporte. Con un reconocimiento especial para **Ely, Suha, Cecilia, Joselo, Mateo y Joey**.

Igualmente, quiero expresar mi agradecimiento a los **miembros del jurado** por el tiempo y la experiencia dedicados a evaluar mi trabajo. Sus valiosas observaciones y sugerencias han enriquecido enormemente esta investigación.

Finalmente, estoy profundamente agradecido a mis amigos y a mi familia. Su aliento y su inquebrantable fe en mí han sido fuente de fortaleza y determinación a lo largo de este proceso.

*A quienes dejaron todo por el hambre y las guerras,  
buscando esperanza en tierras desconocidas.  
Su herencia revive en nosotros.  
En honor a F. L. y C.R.*

## **RESUMEN**

La digestibilidad de nutrientes es un parámetro clave en la formulación de dietas para lechones al destete, etapa marcada por una fisiología digestiva inmadura. Frente a las limitaciones éticas y logísticas de los métodos *in vivo*, esta tesis evaluó modificaciones al protocolo *in vitro* de Boisen y Fernández (1997), orientadas a simular las condiciones digestivas del lechón postdestete. En este trabajo se evaluaron condiciones de incubación que pudieran simular de una manera más precisa la digestión de los lechones en comparación al método de referencia standard (Boissen y Fernandez 1997). Se aplicaron tres variantes: incremento del pH gástrico (de 2.0 a 4.0), reducción de la concentración enzimática (50 %) y una combinación de ambas.

En relación a la identificación de condiciones de incubación que pudieran ser representativas de la digestión de los lechones postdestete, se analizaron ocho ingredientes (cuatro cereales y cuatro proteicos), comparando digestibilidad de materia seca, proteína bruta y almidón con datos *in vivo* obtenidos previamente. Los resultados mostraron que el tratamiento que combinó alto pH y baja enzima redujo significativamente la digestibilidad ileal estimada, especialmente en almidón y proteína bruta. Por ejemplo, la digestibilidad de almidón en maíz bajó de 0,846 (STD) a 0,771, alineándose mejor con valores *in vivo*. Para proteína bruta, los ingredientes proteicos evaluados mostraron una caída promedio de 12 puntos porcentuales entre el protocolo estándar (0,883) y el tratamiento más restringido (0,763). Estos ajustes replican con mayor fidelidad la capacidad digestiva reducida del lechón.

En conjunto, las adaptaciones metodológicas propuestas mejoran la representatividad fisiológica del modelo *in vitro*, consolidándose como una herramienta robusta, ética y efectiva para evaluar digestibilidad en lechones al destete.

***Palabras clave:*** Digestibilidad ileal *in vitro*, lechones al destete, sistema Daisy II, bolsas ANKOM F-57, enzimas digestivas, pH gástrico, reducción enzimática.

## **ABSTRACT**

Nutrient digestibility is a key parameter in diet formulation for weaned piglets, a stage characterized by immature digestive physiology. Given the ethical and logistical limitations of *in vivo* methods, this thesis evaluated modifications to the *in vitro* protocol of Boisen and Fernández (1997), aimed at simulating the digestive conditions of the post-weaning piglet. Throughout this work, tests were conducted to implement variations in incubation conditions that could more accurately simulate piglet digestion compared to the standard reference method (Boisen and Fernández 1997). Three variants were applied: an increase in gastric pH (from 2.0 to 4.0), a reduction in enzyme concentration (50%), and a combination of both.

With respect to identifying incubation conditions that could be representative of post-weaning piglet digestion, eight ingredients (four cereals and four protein sources) were analyzed, comparing dry matter, crude protein, and starch digestibility with previously obtained *in vivo* data. Results showed that the treatment combining high pH and low enzyme levels significantly reduced estimated ileal digestibility, especially for starch and crude protein. For example, maize starch digestibility decreased from 0.846 (STD) to 0.771, aligning more closely with *in vivo* values. For crude protein, the protein sources tested showed an average drop of 12 percentage points between the standard protocol (0.883) and the most restricted treatment (0.763). These adjustments more faithfully replicate the reduced digestive capacity of the piglet.

Overall, the proposed methodological adaptations enhance the physiological representativeness of the *in vitro* model, establishing it as a robust, ethical, and effective tool for evaluating digestibility in weaned piglets.

**Key words:** *In vitro* ileal digestibility, weaned piglets, Daisy II system, ANKOM F-57 bags, digestive enzymes, gastric pH, enzyme reduction.

## RÉSUMÉ

La digestibilité des nutriments est un paramètre clé dans la formulation de régimes pour les porcelets sevrés, une étape marquée par une physiologie digestive immature. Face aux limites éthiques et logistiques des méthodes *in vivo*, cette thèse a évalué des modifications au protocole *in vitro* de Boisen et Fernández (1997), visant à simuler les conditions digestives du porcelet post-sevrage. Tout au long de ce travail, des essais ont été réalisés pour mettre en place un protocole de digestion *in vitro* par la suite, des conditions d'incubation ont été évaluées afin de simuler plus précisément la digestion des porcelets par rapport à la méthode de référence standard (Boisen et Fernández 1997). Trois variantes ont été appliquées : augmentation du pH gastrique (de 2,0 à 4,0), réduction de la concentration enzymatique (50 %) et combinaison des deux.

En ce qui concerne l'identification de conditions d'incubation pouvant représenter la digestion des porcelets post-sevrage, huit ingrédients (quatre céréales et quatre sources protéiques) ont été analysés, en comparant la digestibilité de la matière sèche, des protéines brutes et de l'amidon avec des données *in vivo* obtenues précédemment. Les résultats ont montré que le traitement combinant pH élevé et faible niveau enzymatique a réduit de manière significative la digestibilité iléale estimée, en particulier pour l'amidon et les protéines brutes. Par exemple, la digestibilité de l'amidon du maïs est passée de 0,846 (STD) à 0,771, se rapprochant davantage des valeurs *in vivo*. Pour les protéines brutes, les sources protéiques testées ont montré une baisse moyenne de 12 points de pourcentage entre le protocole standard (0,883) et le traitement le plus restrictif (0,763). Ces ajustements reproduisent plus fidèlement la capacité digestive réduite du porcelet.

Dans l'ensemble, les adaptations méthodologiques proposées améliorent la représentativité physiologique du modèle *in vitro*, s'imposant comme un outil robuste, éthique et efficace pour évaluer la digestibilité chez les porcelets sevrés.

**Mots-clés :** digestibilité iléale *in vitro*, porcelets au sevrage, système Daisy II, sachets ANKOM F-57, enzymes digestives, pH gastrique, réduction enzymatique.

## **DECLARACIONES DEL AUTOR**

Declaro que el presente trabajo de tesis ha sido realizado de manera original e independiente, y que todas las fuentes utilizadas han sido debidamente citadas conforme a los estándares académicos establecidos.

Durante el proceso de redacción, reestructuración y corrección del presente documento, utilicé como herramienta de apoyo el modelo de inteligencia artificial generativa ChatGPT, desarrollado por OpenAI (2024), específicamente mediante el acceso a la versión Plus (GPT-4), disponible en la plataforma <https://chat.openai.com>. Esta herramienta fue empleada para tareas como reformulación de párrafos, mejora de la coherencia textual, sugerencias de estilo académico y corrección orto tipográfica, siempre bajo mi supervisión directa, validando, adaptando o descartando sus aportes conforme a los criterios académicos y científicos de mi elección. ChatGPT no intervino en el diseño metodológico, análisis de resultados ni en la elaboración del contenido científico de la tesis, limitándose exclusivamente a funciones lingüísticas y de apoyo técnico a la escritura.

Declaro expresamente que pese a que el presente trabajo ha recibido financiación por parte de instituciones públicas, entidades privadas y organizaciones con intereses comerciales relacionados. La totalidad del estudio ha sido desarrollada de manera independiente, sin injerencias externas que pudieran comprometer la integridad de los resultados. Asimismo, aseguro que la investigación se ha llevado a cabo conforme a los principios del método científico, respetando de manera estricta el marco metodológico previamente definido, así como los criterios de objetividad, reproducibilidad y validez científica que exige la disciplina.

## **TABLA DE CUADROS**

|  |    |
|--|----|
| TABLA N. <sup>o</sup> 4: VARIACIÓN ESPERADA EN IVD-MS SEGÚN FACTOR DE VARIACIÓN PARA DIFERENTES ALIMENTOS .....  | 20 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 5: CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL NITRÓGENO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA PEPSINA Y PEPSINA + PANCREATINA EN HARINA DE SOJA.....   | 21 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 6: DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA IN VIVO EN CERDOS EN CRECIMIENTO E IN VITRO POR DOS MÉTODOS DIFERENTES .....  | 22 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 7: DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA ORGÁNICA IN VIVO EN CERDOS EN CRECIMIENTO E IN VITRO POR DOS MÉTODOS DIFERENTES .....  | 23 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 8: DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA CRUDA IN VIVO PARA CERDOS EN CRECIMIENTO.....   | 23 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 9: EFECTO DE LA CORRECCIÓN POR BLANCO PARA MATERIA SECA Y PROTEÍNA BRUTA EN MAÍZ Y HARINA DE SOJA.....   | 24 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 10: DIGESTIBILIDAD ILEAL DEL ALMIDÓN IN VIVO EN CERDOS EN CRECIMIENTO PARA DIFERENTES CEREALES.....  | 24 |
| ‘TABLA N. <sup>o</sup> 11: DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN EN BROILERS PARA DIFERENTES CEREALES Y SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO .....   | 25 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 12: EFECTO DE LA RELACIÓN AMILOPECTINA DEL ALMIDÓN AL VARIAR CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.....  | 25 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 13: COMPARACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD IN VIVO E IN VITRO DE LA PROTEÍNA BRUTA Y AMINOÁCIDOS EN LECHONES DESTETADOS.....   | 26 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 14: ACTIVIDAD DE PEPSINA SEGÚN EDAD EN LECHONES AL DESTETE.....  | 28 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 15: EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PRE Y POST DESTETE EN LECHONES .....  | 29 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 16: CONDICIONES DE INCUBACIÓN PARA LOS PROTOCOLOS PROPUESTOS Y EL DE REFERENCIA.....   | 38 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 17: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CEREALES EVALUADOS. (EN BASE FRESCA).....   | 42 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 18: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PROTEICOS EVALUADOS. (EN BASE FRESCA).....  | 42 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 19: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS FIBROSOS EVALUADOS. (EN BASE FRESCA).....   | 42 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 20: COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDAD ILEAL Y FECAL DE LA MATERIA SECA Y ALMIDÓN PARA LOS CEREALES EN EL EXPERIMENTO IN VIVO .....  | 45 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 21: COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDAD ILEAL Y FECAL DE LA MATERIA SECA Y PROTEÍNA BRUTA PARA LOS PROTEICOS EN EL EXPERIMENTO IN VIVO .....                                  | 45 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 32: PROMEDIO DE LOS EFECTOS DE CADA TRATAMIENTO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA MS Y ALMIDÓN.....  | 49 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 33: SIGNIFICANCIA DE LOS EFECTOS INDIVIDUALES Y SU INTERACCIÓN SOBRE LAS VARIABLES.....  | 49 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 34: COMPARATIVA DE MEDIAS ENTRE TODOS LOS TRATAMIENTOS E INGREDIENTES (M, T, C, CE) PARA LA VARIABLE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA (MS) .....         | 50 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 35: COMPARATIVA DE MEDIAS ENTRE TODOS LOS TRATAMIENTOS E INGREDIENTES PARA LA VARIABLE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN.....                                    | 50 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 36: PROMEDIO DE LOS EFECTOS DE CADA TRATAMIENTO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA MS Y PB.....   | 52 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 37: SIGNIFICANCIA DE LOS EFECTOS INDIVIDUALES Y SU INTERACCIÓN SOBRE LAS VARIABLES .....   | 52 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 38: COMPARATIVA DE MEDIAS ENTRE TODOS LOS TRATAMIENTOS E INGREDIENTES (SBM, ASOY, RSM, SFM) PARA LA VARIABLE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA (MS) ..... | 53 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 39: COMPARATIVA DE MEDIAS ENTRE TODOS LOS TRATAMIENTOS E INGREDIENTES PARA LA VARIABLE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA BRUTA (PB).....                      | 53 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 40: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS RESPECTO A CERDOS EN CRECIMIENTO PARA LA MS DE CEREALES.....   | 61 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 41: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS DE LA DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN. .....  | 61 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 42: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS RESPECTO A CERDOS EN CRECIMIENTO PARA LA MS DE PROTEICOS.....  | 63 |
| TABLA N. <sup>o</sup> 43: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS DE LA DIGESTIBILIDAD DE LA PB .....  | 63 |

## **TABLA DE ILUSTRACIONES**

|   |    |
|---|----|
| FIGURA N. <sup>o</sup> 1: SISTEMA DE INCUBACIÓN DINÁMICO .....  | 13 |
| FIGURA N. <sup>o</sup> 2: COMPARATIVA ENTRE LOS PROTOCOLOS MÁS GENERALIZADOS.....   | 14 |
| FIGURA N. <sup>o</sup> 3: RELACIÓN ENTRE LA DIGESTIBILIDAD APARENTE DE LA ENERGÍA IN VIVO E IN VITRO.....                                   | 15 |
| FIGURA N. <sup>o</sup> 4: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DIFERENTES PEPSINAS ENTRE LABORATORIOS.....   | 16 |
| FIGURA N. <sup>o</sup> 5: CORRELACIÓN ENTRE DIGESTIBILIDAD IN VITRO E IN VIVO .....   | 17 |
| FIGURA N. <sup>o</sup> 6: DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA SEGÚN POSICIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE MEDICIÓN..                            | 18 |
| FIGURA N. <sup>o</sup> 7: DIGESTIBILIDAD ILEAL ESTANDARIZADA DE LA PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS A PARTIR DE LOS VALORES IN VIVO E IN VITRO. ..... | 19 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA N.º 10: PERFILES DE DEGRADACIÓN DE LA MATERIA SECA DE ALIMENTOS CONTRASTANTES DESPUÉS DE CADA ETAPA DE INCUBACIÓN.....                                      | 22 |
| FIGURA N.º 12: EVOLUCIÓN DE LA SECRECIÓN DE PEPSINA POS-INFUSIÓN PARA TRES EDADES DIFERENTES.....  | 28 |
| FIGURA N.º 13: EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PRE Y POST DESTETE EN LECHONES.....  | 30 |
| FIGURA N.º 14: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MEDIDA ANTES Y POST DESTETE.....   | 31 |
| FIGURA N.º 11: RELACIÓN ENTRE FIBRA DIETARIA TOTAL (TDF), SOLUBLE (SDF), INSOLUBLE (IDF) Y LA DIGESTIBILIDAD APARENTE DE LA PROTEÍNA BRUTA.....                    | 32 |
| FIGURA N.º 23: DIGESTIBILIDAD ILEAL DE LA MATERIA SECA Y DEL ALMIDÓN PARA LOS CEREALES (M, T, C Y CE) SEGÚN EL MÉTODO DE REFERENCIA (STD) ADAPTADO.....            | 47 |
| FIGURA N.º 24: DIGESTIBILIDAD ILEAL DE LA MATERIA SECA Y DE LA PROTEÍNA PARA LOS PROTEICOS (SBM, ASOY, RSM, SFM) SEGÚN EL MÉTODO DE REFERENCIA (STD) ADAPTADO..... | 48 |
| FIGURA N.º 25: COMPARATIVA DE DIGESTIBILIDAD DE LA MS Y ALMIDÓN POR INGREDIENTE DE LOS TRES TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS RELATIVO PORCENTUAL AL STD.....              | 51 |
| FIGURA N.º 26: COMPARATIVA DE DIGESTIBILIDAD DE LA MS Y PB POR INGREDIENTE DE LOS TRES TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS RELATIVO PORCENTUAL AL STD.....                   | 54 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

IVD: Digestibilidad in vitro

MS: Materia seca

MO: Materia orgánica

PB: Proteína bruta

ADF: Fibra detergente ácido

aNDF: Fibra detergente neutro

ADL: Lignina

DE: Energía digestible

SBM: Harina de soja

RSM: Harina de colza

ASOY: Concentrado de harina de soja

SFM: Concentrado de harina de girasol

DDGS: Granos secos de destilerías con solubles

SBP: Pulpa de remolacha

WB: Salvado de trigo

GF: Gluten feed

## **ÍNDICE**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>RESUMEN .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>RÉSUMÉ .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>DECLARACIONES DEL AUTOR .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>TABLA DE CUADROS.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>TABLA DE ILUSTRACIONES.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>ÍNDICE.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>12</b> |
| DIGESTIBILIDAD <i>IN VIVO</i> .....  | 12        |
| DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> .....   | 12        |
| MÉTODOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> .....            | 13        |
| <i>Métodos dinámicos</i> .....   | 13        |
| <i>Métodos estáticos</i> .....   | 14        |
| ALTERNATIVAS RECIENTES .....   | 15        |
| INTERPRETACIÓN DE LAS DIFERENCIAS ENTRE <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> .....   | 17        |
| CONDICIONES DE INCUBACION.....   | 19        |
| <i>Concentración enzimática</i> .....  | 20        |
| <i>Cinética de degradación in vitro</i> .....                                    | 20        |
| DIGESTIBILIDAD <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> EN CERDOS EN CRECIMIENTO.....    | 22        |
| <i>Digestibilidad de la proteína bruta</i> .....                                 | 23        |
| <i>Digestibilidad del almidón</i> .....  | 24        |
| <i>Relación amilosa : amilopectina</i> .....                                     | 25        |
| DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> EN LECHONES ..... | 26        |
| DESARROLLO ENZIMÁTICO .....  | 27        |
| DIGESTIÓN EN ESTÓMAGO E INTESTINO DELGADO .....                                  | 27        |
| EFECTO DE LA FIBRA SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA .....                  | 32        |
| <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>33</b> |
| GENERALES .....  | 33        |
| ESPECÍFICOS.....   | 33        |
| <b>HIPÓTESIS .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>34</b> |
| DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TÉCNICA.....   | 34        |
| <i>Corrección por materia seca de bolsas</i> .....                               | 35        |
| <i>Correcciones por actividad enzimática</i> .....                               | 35        |
| CONDICIONES DE INCUBACION.....   | 37        |
| <i>Tratamientos</i> .....  | 37        |
| <i>VARIABLES analizadas</i> .....  | 38        |
| <i>Análisis estadísticos</i> .....   | 39        |
| COMPOSICIÓN QUÍMICA DE INGREDIENTES.....   | 42        |
| DIGESTIBILIDAD <i>IN VIVO</i> .....  | 42        |
| <i>VARIABLES analizadas</i> .....  | 43        |
| <i>Análisis Estadístico</i> .....  | 44        |
| VALORES DE DIGESTIBILIDAD <i>IN VIVO</i> .....                                   | 45        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>  | <b>46</b> |
| DIGESTIBILIDAD IN VITRO POR EL METODO DE REFERENCIA ADAPTADO (STD) .....                                       | 46        |
| <i>Cereales : Maíz, Trigo, Cebada, Cebada Extrusionada.....</i>  | 46        |
| <i>Proteicos: Harina de soja, concentrado de soja, harina de colza y concentrado proteico de girasol .....</i> | 47        |
| EFECTOS DE LAS MODIFICACIONES PROPUESTAS (IN VITRO).....   | 49        |
| <i>Cereales .....</i>  | 49        |
| <i>Proteicos .....</i>   | 52        |
| <i>Conclusión General.....</i>   | 55        |
| COMPARATIVA DE LAS ALTERNATIVAS IN VITRO RESPECTO A LOS RESULTADOS IN VIVO.....                                | 56        |
| <i>Cereales .....</i>  | 56        |
| <i>Proteicos .....</i>   | 58        |
| COMPARATIVA CON LOS RESULTADO EN CERDOS EN CRECIMEINTO.....  | 60        |
| <i>Cereales .....</i>  | 60        |
| <i>Proteicos .....</i>   | 62        |
| DISCUSION GENERAL.....   | 64        |
| <b>CONCLUSIÓN .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>ANEXO .....</b>   | <b>66</b> |
| I. DIETAS.....   | 66        |
| II. ANALISIS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.....  | 68        |
| III. FOTOS .....   | 69        |
| IV- PROCEDIMIENTO DIGESTION KJELDAHL (AJUSTE DE TEMPERATURA Y TIEMPO).....                                     | 73        |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>74</b> |

## INTRODUCCIÓN

Formular dietas mediante programación lineal requiere asumir la aditividad de los ingredientes como concepto, lo que implica que podemos cuantificar y equilibrar los nutrientes digestibles de los ingredientes, con énfasis en la energía, el nitrógeno y el fósforo (Boisen, 2007a). Estimar la digestibilidad de manera estandarizada y repetible permite categorizar los alimentos, asignándoles un valor nutritivo que informa tanto sobre su asimilación como sobre su excreción.

Si bien los métodos *in vivo* son y seguirán siendo el estándar de referencia para obtener información real en animales específicos (ya sean en crecimiento o adultos, cerdos o aves, entre otros); los métodos *in vitro* representan una alternativa sencilla para estimar la digestibilidad. Su interés ha ido en aumento en una sociedad que busca reducir el uso de animales experimentales y evitar prácticas invasivas como el uso de cánulas y cirugías.

Existen diversos métodos *in vitro* para la estimación de la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica, energía, nitrógeno, aminoácidos y almidón. Hasta el momento, la información disponible se ha centrado mayoritariamente en animales adultos y en crecimiento, ya que éstas han sido las principales categorías estudiadas.

Entre los métodos más reconocidos, los propuestos por (Boisen y Fernández 1995, 1997) han sido ampliamente utilizados y continúan siendo una referencia recurrente en la literatura científica.

Sin embargo, en animales más jóvenes, especialmente en períodos críticos de maduración digestiva, como la fase de destete, la información disponible es más limitada. Actualmente, no existen métodos de referencia o de uso generalizado que aporten datos fiables para esta etapa. Es previsible que los métodos desarrollados a partir de animales en crecimiento no se ajusten adecuadamente a la inmadurez digestiva de los animales destetados, lo que evidencia la necesidad de adaptar y modificar las técnicas existentes para obtener resultados más precisos.

En el caso particular de los lechones, contar con métodos confiables para estimar la digestibilidad en el período postdestete permitiría diseñar fórmulas que optimicen la sincronización entre la digestión y la absorción de los nutrientes. Esto contribuiría a evitar excesos de proteína fermentable en el intestino, reduciendo así la incidencia de diarreas postdestete, así como las pérdidas en rendimiento y bienestar animal.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### DIGESTIBILIDAD *IN VIVO*

Las pruebas de digestibilidad **in vivo** se realizan bajo condiciones estrictamente controladas y requieren diseños experimentales complejos y de alto costo. Están determinadas por procesos fisiológicos con múltiples interacciones simultáneas, lo que incrementa su nivel de complejidad (Moughan, 1999).

Estos experimentos proporcionan la información más precisa sobre los parámetros relevantes. Sin embargo, en la actualidad, la sociedad cuestiona estos procedimientos, ya que suelen implicar cirugías, sacrificios y condiciones nutricionales subóptimas, lo que puede contravenir los acuerdos e intereses relacionados con el bienestar animal (Sert et al., 2020).

En este contexto, los métodos **in vitro** se proponen como una alternativa viable para reducir las limitaciones éticas y logísticas de los ensayos **in vivo**. Sin embargo, su mejora y adaptación son necesarias para representar con mayor fidelidad las condiciones fisiológicas reales.

### DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

Las técnicas **in vitro** son ampliamente utilizadas por su bajo costo, simplicidad operativa y alta repetitividad. No obstante, reproducir con precisión las complejas interacciones entre enzimas digestivas, microbiota intestinal y propiedades fisicoquímicas del alimento sigue siendo un desafío importante (Moughan, 1999).

Los métodos **in vitro** se agrupan en dos grandes categorías:

**Dinámicos**, que permiten un control riguroso de múltiples variables fisiológicas.

**Estáticos**, caracterizados por su simplicidad, bajo costo y rapidez de ejecución.

En términos comparativos, los métodos **dinámicos** tienden a subestimar los valores de digestibilidad respecto a los obtenidos **in vivo**, mientras que los métodos **estáticos** suelen sobreestimarlos (Moughan, 1999).

Los **métodos difieren en su enfoque analítico**: algunos miden la **disminución del pH**, otros la **solubilización de nutrientes** o la **cantidad de residuos insolubles** tras la digestión enzimática. Las condiciones de incubación también varían en parámetros como pH, temperatura y tipo o concentración de enzimas utilizadas (Boisen & Eggum, 1991).

## MÉTODOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

### Métodos dinámicos

Los métodos **dinámicos** están diseñados para ofrecer un control más preciso sobre las condiciones experimentales, pero su implementación es compleja y de uso limitado. Un ejemplo es el protocolo de (Kim et al., 2024), desarrollado para estimar la digestibilidad en cerdos, que requiere equipamiento tecnológico avanzado (Figura N.<sup>o</sup> 1), lo que restringe su aplicación a gran escala.

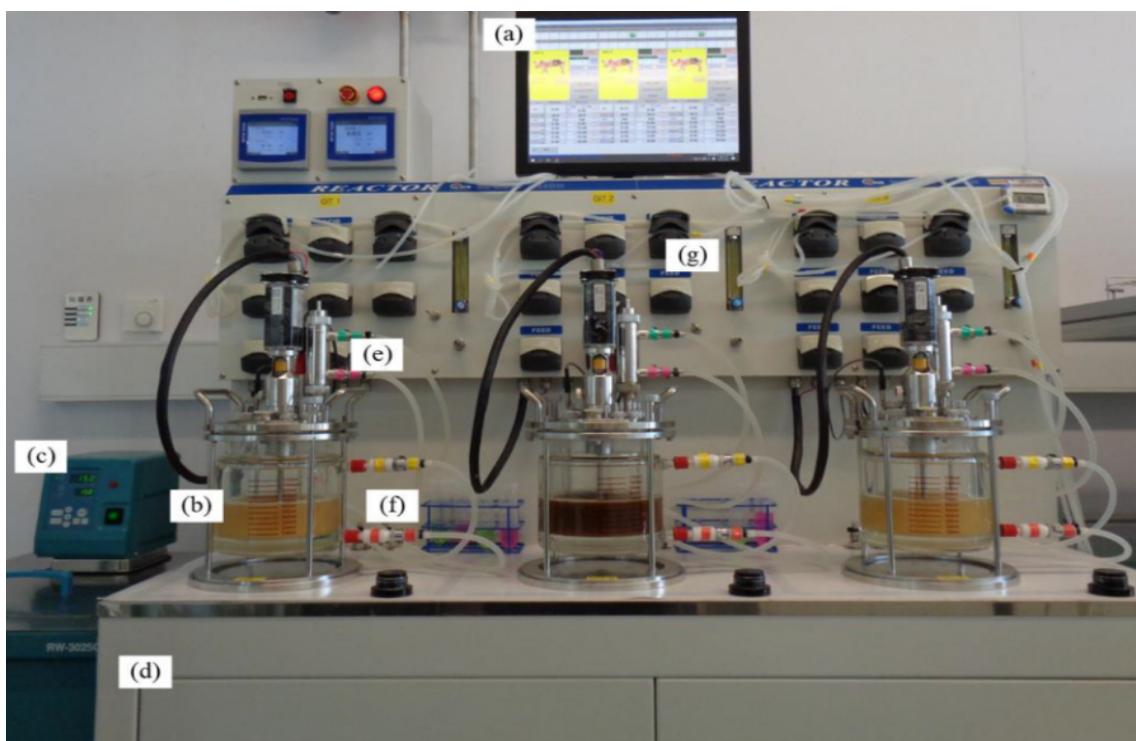


Figura N.<sup>o</sup> 1: Sistema de incubación dinámico.

Tomado de (Kim et al., 2024). Donde: (a) panel de control; (b) cámara de digestión aislada; (c) equipo de enfriamiento; (d) cámara de calor; (e) línea de frío; (f) línea de calor y (g) bomba de alimentación.

## Métodos estáticos

Boisen & Fernández (1995) propusieron un método de dos etapas diseñado para simular las fases de digestión en el estómago y el intestino delgado (IVID). Posteriormente, Boisen & Fernández (1997) validaron y refinaron este método, desarrollando una incubación enzimática de tres etapas (IVTTD) (Figura N.º 2 - Ha et al., 2020)), categorizándolo como una herramienta de alto potencial práctico. Este método ha demostrado alta aplicabilidad práctica y continúa siendo una referencia central en la literatura científica.

A pesar del tiempo transcurrido desde su publicación, los métodos propuestos por Boisen & Fernández siguen siendo ampliamente utilizados. Según datos de Web of Science, mantienen un promedio de 38 citas anuales a Boisen & Fernández (1997), lo que refleja su relevancia continua en el campo.

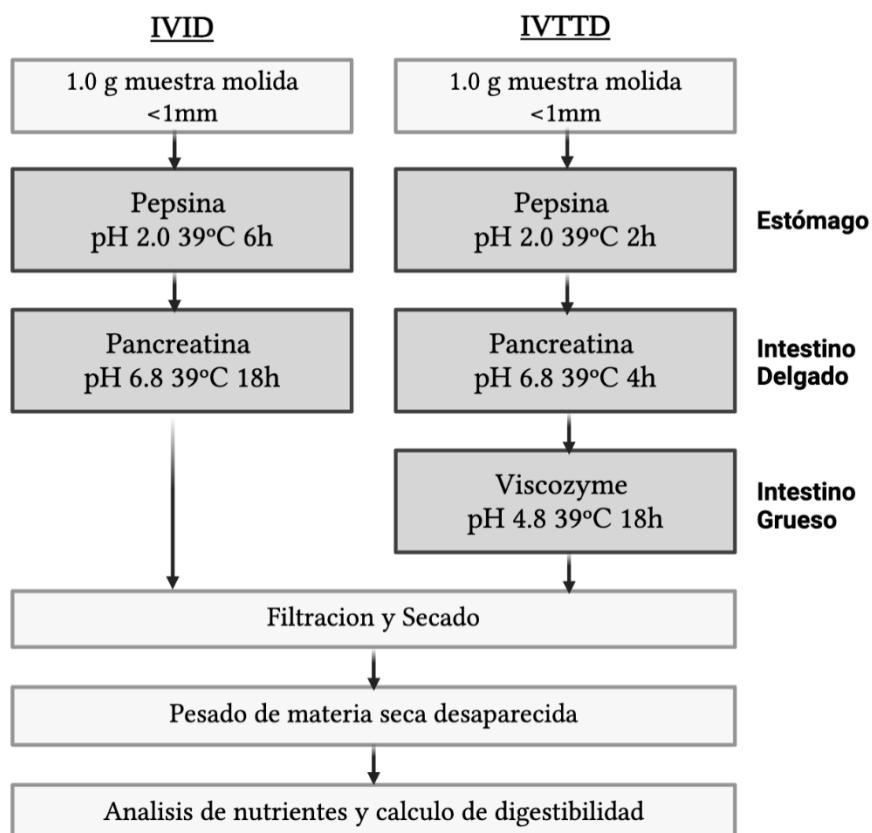


Figura N.º 2: Comparativa entre los protocolos más generalizados.

Tomado de (Ha et al., 2020). Donde: (IVID) digestibilidad ileal in vitro (Boisen y Fernández 1995); (IVTTD) digestibilidad total in vitro (Boisen y Fernández 1997).

Existen otros métodos estáticos con variaciones menores respecto al protocolo de Boisen & Fernández (1997), aunque con menor difusión y respaldo científico. Uno de los más destacados es el propuesto por Huang et al. (2003), que modifica la tercera etapa del protocolo, reemplazando **Viscozyme ®** por **celulasa**. Sin embargo, esta modificación presenta un ajuste relativamente pequeño frente a los métodos originales (Regmi et al., 2009).

La relación entre la digestibilidad aparente de la energía medida **in vivo** y los valores obtenidos **in vitro** puede observarse comparando los métodos de Boisen & Fernández (1997) y Huang et al. (2003). Ambos muestran una alta correlación, aunque con ligeras diferencias atribuibles al tipo de enzima utilizada en la tercera etapa (Figura N.º 3). A lo largo de este documento, se ha utilizado el protocolo de Boisen & Fernández (1997) como **método de referencia (“Gold Standard”)** tanto en el análisis contextual como en el analítico.

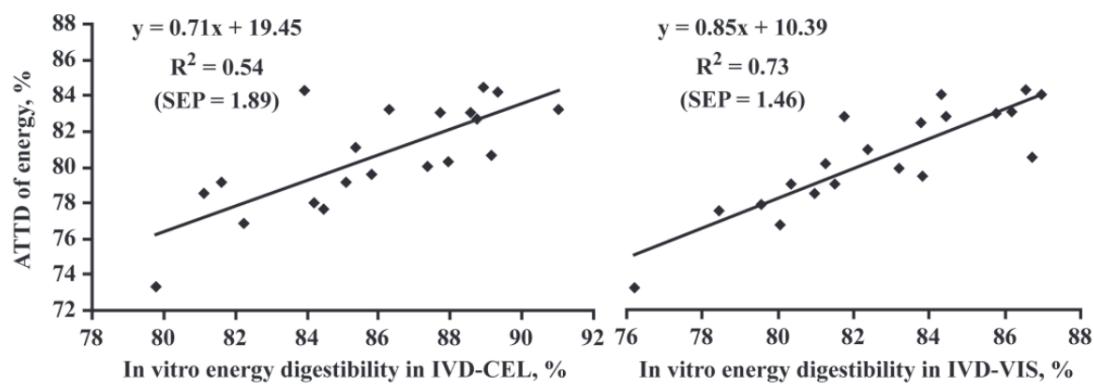


Figura N.º 3: Relación entre la digestibilidad aparente de la energía *in vivo* e *in vitro*.

Tomado de (Regmi et al., 2009). Donde: (IVDVIS) digestibilidad total *in vitro* (Boisen y Fernández 1997); (IVD-CEL) digestibilidad total *in vitro* (Huang et al., 2003).

## ALTERNATIVAS RECIENTES

Egger et al. (2016) compararon resultados de **distintos laboratorios** al analizar una **misma muestra** de leche en polvo y encontraron una **alta variabilidad**. Esta fue atribuida principalmente a **diferencias en la actividad enzimática y al control del pH**, lo que evidencia que seguir un **mismo protocolo no garantiza uniformidad** si no se estandarizan estos factores críticos.

Para abordar esta variabilidad, Egger et al. (2016) evaluaron el protocolo **Harmonized INFOGEST**, originalmente desarrollado para simular la digestión humana (Minekus et al., 2014). Este método ofrece un mayor control sobre la actividad enzimática y el pH, combinando elementos estáticos con cierto grado de dinámica. Los resultados indicaron que las principales discrepancias se producen en la fase gástrica, debido a la variabilidad en la actividad de la **pepsina** entre laboratorios. La Figura N.º 4 ilustra esta variabilidad según Egger et al. (2016).

En estudios posteriores, Egger et al. (2017) compararon el protocolo **Harmonized INFOGEST** con resultados **in vivo** y concluyeron que presenta una buena concordancia en la hidrólisis de proteínas, validando su uso como alternativa metodológica confiable.

A pesar de sus resultados prometedores, el protocolo **Harmonized INFOGEST** requiere **más tiempo de ejecución y presenta limitaciones prácticas** que dificultan su implementación generalizada, especialmente frente al método de Boisen & Fernández (1997).

Los estudios de **Boisen & Fernández (1995, 1997)** y **Egger et al. (2016, 2017)** se han **centrado en cerdos en crecimiento**, con pesos entre 25 y 40 kg. Sin embargo, la información disponible sobre la correlación entre resultados **in vitro** e **in vivo** en **lechones destetados es escasa**, lo que limita la extrapolación de estos métodos a esta categoría.

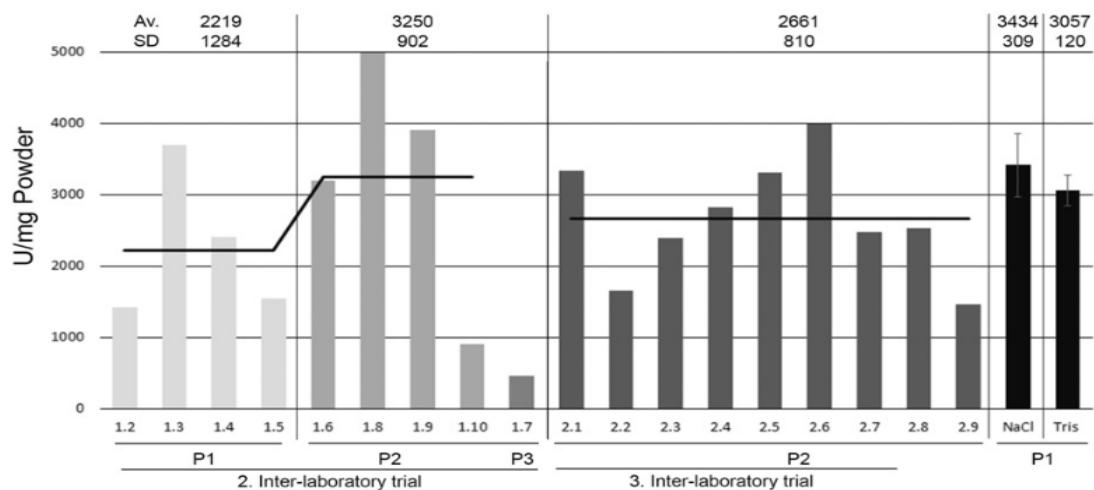


Figura N.º 4: Actividad enzimática de diferentes pepsinas entre laboratorios.

Tomado de (Egger et al., 2016). Donde: (P1) Sigma P6887; (P2) Sigma P7012; (P3) Sigma P7000.

## INTERPRETACIÓN DE LAS DIFERENCIAS ENTRE IN VIVO E IN VITRO

Si bien no es realista esperar que los ensayos **in vitro** reproduzcan exactamente los resultados **in vivo**, su uso ha demostrado ser una herramienta práctica y válida en la evaluación de digestibilidad (Moughan, 1999).

Tal como se observa en la Figura N.<sup>o</sup> 5, existe una correlación significativa entre los valores de digestibilidad **in vivo** e **in vitro**. Sin embargo, los métodos **in vitro** tienden a **sobreestimar los resultados**, tanto en ingredientes individuales como en dietas completas.

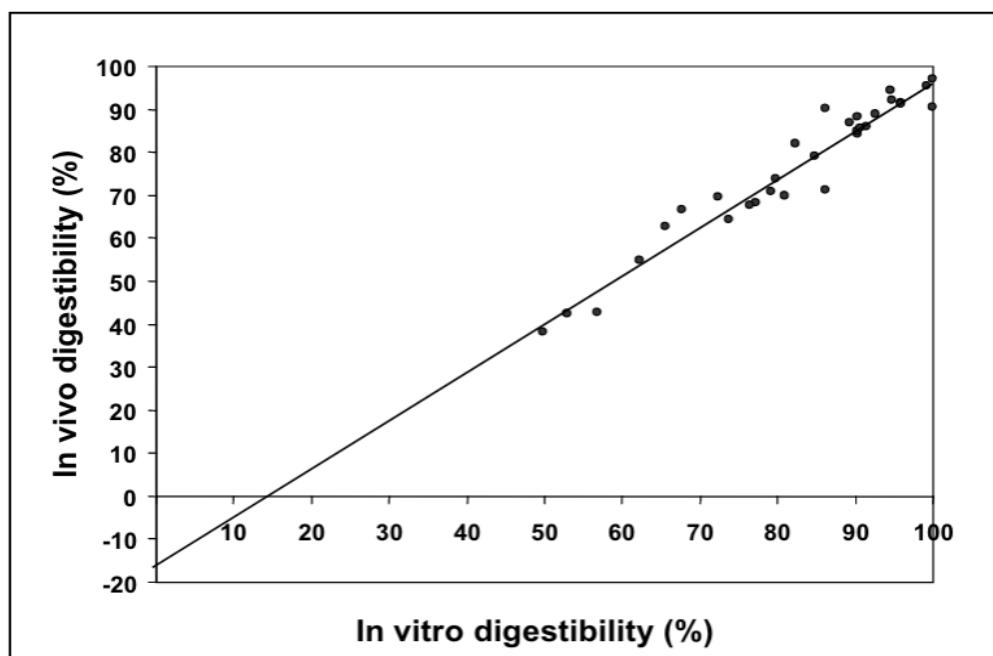


Figura N.<sup>o</sup> 5: Correlación entre digestibilidad in vitro e in vivo.

Tomado de (Boisen, 2007b) en base a la información de (Boisen & Fernández, 1997).

Las discrepancias entre los valores **in vitro** y los datos reales **in vivo** se deben principalmente a la influencia de la **fracción fibrosa**, que afecta el **tránsito intestinal** y el **consumo voluntario**. Otros factores incluyen la presencia de **anti nutrientes**, alteraciones en la **capacidad de absorción**, y la interferencia de **secreciones endógenas**, **enzimas digestivas** y la **microbiota intestinal**, cuya actividad fermentativa no se reproduce adecuadamente **in vitro** (Moughan, 1999).

Es fundamental distinguir entre **digestibilidad aparente, real y estandarizada**, ya que cada una ofrece una interpretación diferente sobre la eficiencia en la utilización de

la proteína. Esta diferenciación permite una evaluación más precisa del valor nutricional de los ingredientes (Figuras N.º 6 y 7).

Las **pérdidas endógenas** se dividen en dos componentes: una pérdida **basal**, asociada al mantenimiento fisiológico, y una pérdida **adicional (extra)** inducida en parte por el alimento, que se relaciona directamente con el nivel de **materia seca indigestible** presente en la dieta (Boisen, 2007b).

La **digestibilidad estandarizada** de la proteína y los aminoácidos se obtiene corrigiendo los valores in vitro por las pérdidas endógenas basales, las cuales pueden estimarse con una dieta libre de nitrógeno y bajo contenido de materia (Figura N.º 7) (Boisen S. 1998, 2007a).

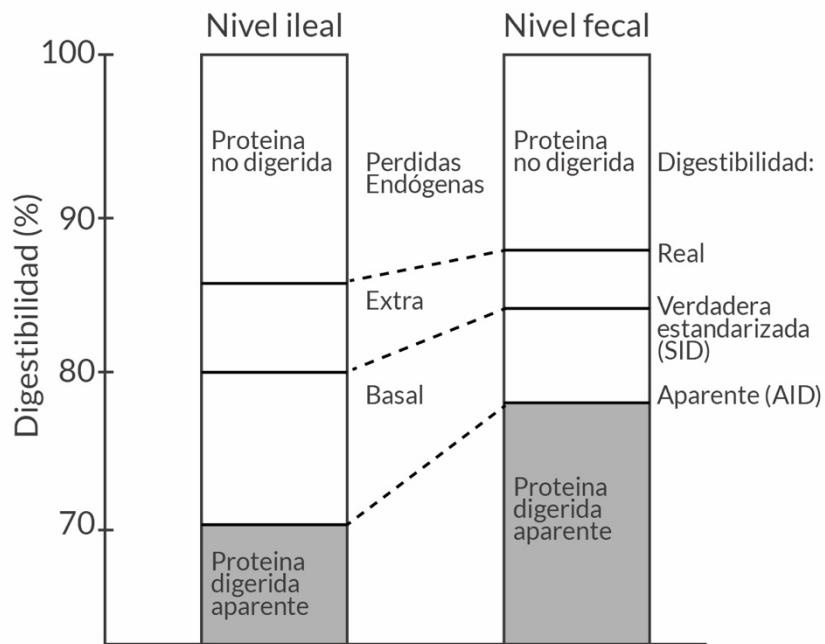


Figura N.º 6: Digestibilidad de la proteína según posición del tracto gastrointestinal de medición.

Adaptado de (Boisen, 1998).

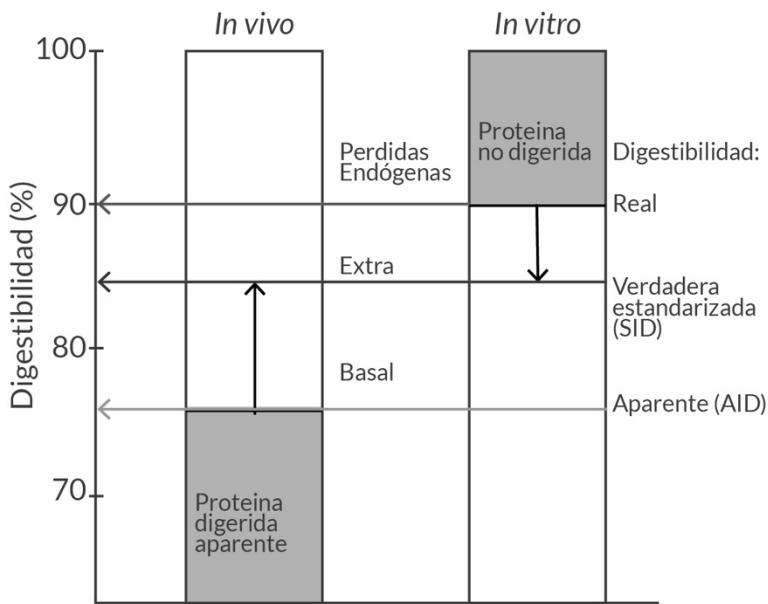


Figura N.<sup>o</sup> 7: Digestibilidad ileal estandarizada de la proteína y aminoácidos a partir de los valores *in vivo* e *in vitro*.

Tomado de (Boisen, 2007a) a partir de (Boisen, 1998).

## CONDICIONES DE INCUBACION

Según Boisen & Fernández (1997), las principales fuentes de variación en los ensayos de digestibilidad *in vitro* son el **procesamiento de la muestra**, el **tamaño de partícula**, y la **agitación constante** durante la incubación. La Tabla N.<sup>o</sup> 4 resume el impacto de estos factores en alimentos de uso común.

En términos generales, las **fuentes proteicas** son **más sensibles a variaciones** en el **tamaño de partícula** que los **cereales**. Por su parte, tanto la **agitación** como el **procesamiento previo de la muestra** afectan de forma significativa la digestibilidad en todos los tipos de ingredientes.

Además, la **adición de EDTA** presenta un efecto poco significativo y tiende a reducir los valores de digestibilidad. En cambio, la incorporación de **Celluclast®**, una enzima celulolítica aplicada en la tercera etapa del protocolo, puede aumentar el coeficiente de digestibilidad.

Tabla N.º 1: Variación esperada en IVD-MS según factor de variación para diferentes alimentos.

| Feedstuff | Standard (%) | Particle size<br>< 3 mm (%) | Sample weight<br>1.0 g (%) | Reduced<br>stirring (%) | Cellulast (%) | Without EDTA (%) |
|-----------|--------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------|------------------|
| Barley    | 84,8         | (2,30)                      | (0,20)                     | (1,70)                  | 1,50          | (0,30)           |
| Wheat     | 91,4         | (0,10)                      | -                          | (0,70)                  | 1,40          | -                |
| Maize     | 90,3         | (1,40)                      | -                          | (4,70)                  | 0,20          | (0,20)           |
| SBM       | 90,2         | (0,40)                      | (1,70)                     | (0,30)                  | 4,00          | (0,80)           |
| SFM       | 73,8         | (0,60)                      | (0,80)                     | -                       | 2,90          | (0,90)           |
| RPM       | 79,2         | 0,60                        | (1,00)                     | (0,50)                  | 0,80          | -                |

A partir de (Boisen & Fernández, 1997) Donde: IVDMS es la digestibilidad de la materia seca.

### Concentración enzimática

Son & Kim (2023) evaluaron una modificación del método de referencia para **simular las condiciones digestivas de lechones al destete**. Su estudio evidenció diferencias in vitro en distintos productos fermentados derivados de harina de soja, al aplicar cambios sobre el protocolo original de Boisen & Fernández (1995).

Las modificaciones incluyeron una **reducción del tiempo de incubación a la mitad** en la segunda etapa —para reflejar el menor tiempo de tránsito digestivo— y una **disminución del 50 % en la concentración enzimática**. Aunque se observaron diferencias significativas entre ingredientes, los autores concluyen que estos resultados deben validarse mediante comparación con datos **in vivo** para ser considerados concluyentes.

### Cinética de degradación in vitro

Chen et al. (2019) propusieron **elevar el pH** de incubación de **2.0 a 3.5** en la primera etapa del protocolo, argumentando que este valor representa de forma más realista las **condiciones gástricas**, especialmente en animales jóvenes.

Además, sugirieron incrementar la **cantidad de muestra de 0,5 a 1 gramo**, en contraste con lo indicado en el protocolo original, postura que ha sido **discutida por otros autores** como Cervantes-Pahm (2011).

En cuanto a la **cinética de degradación**, utilizando harina de soja, Chen et al. (2019) determinaron que **60 minutos de incubación con pepsina** son suficientes para alcanzar una meseta de solubilidad del nitrógeno. En la segunda etapa, con **pancreatina**,

observaron que prolongar la incubación más allá de **90 minutos** no genera incrementos significativos, ni en la fracción soluble ni en la insoluble de nitrógeno (Tabla N.º 5).

*Tabla N.º 2: Cinética de degradación del nitrógeno en función del tiempo para pepsina y pepsina + pancreatina en harina de soja.*

| Medida           | 0     | Pepsina (min) |      |      | Pepsina + Pancreatina (min) |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------|-------|---------------|------|------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                  |       | 30            | 60   | 90   | 0                           | 30   | 60   | 90   | 120  | 150  | 180  | 210  |      |
| <b>N soluble</b> | Media | 0,07          | 0,18 | 0,21 | 0,21                        | 0,50 | 0,83 | 0,88 | 0,90 | 0,91 | 0,92 | 0,93 | 0,92 |
|                  | DE    | 0,06          | 0,04 | 0,03 | 0,02                        | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
|                  | Min   | 0,02          | 0,15 | 0,16 | 0,19                        | 0,47 | 0,80 | 0,85 | 0,89 | 0,90 | 0,91 | 0,92 | 0,91 |
|                  | Max   | 0,17          | 0,24 | 0,31 | 0,23                        | 0,52 | 0,85 | 0,90 | 0,91 | 0,92 | 0,93 | 0,93 | 0,93 |
| <b>HMW</b>       | Media | 0,07          | 0,09 | 0,12 | 0,11                        | 0,39 | 0,57 | 0,58 | 0,58 | 0,60 | 0,58 | 0,60 | 0,54 |
|                  | DE    | 0,06          | 0,02 | 0,04 | 0,02                        | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,01 | 0,05 | 0,02 | 0,06 |
|                  | Min   | 0,02          | 0,07 | 0,08 | 0,09                        | 0,36 | 0,53 | 0,55 | 0,56 | 0,59 | 0,50 | 0,56 | 0,46 |
|                  | Max   | 0,17          | 0,13 | 0,19 | 0,13                        | 0,41 | 0,64 | 0,63 | 0,61 | 0,61 | 0,66 | 0,64 | 0,61 |
| <b>LMW</b>       | Media | 0,00          | 0,08 | 0,09 | 0,10                        | 0,11 | 0,25 | 0,30 | 0,32 | 0,31 | 0,34 | 0,35 | 0,38 |
|                  | DE    | 0,02          | 0,02 | 0,02 | 0,02                        | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,05 | 0,02 | 0,03 |
|                  | Min   | 0,00          | 0,07 | 0,08 | 0,08                        | 0,09 | 0,22 | 0,26 | 0,29 | 0,29 | 0,28 | 0,32 | 0,32 |
|                  | Max   | 0,00          | 0,12 | 0,12 | 0,12                        | 0,11 | 0,30 | 0,34 | 0,37 | 0,33 | 0,42 | 0,38 | 0,44 |

*Tomado de: (Chen et al., 2019). Para el método de referencia, Donde: N solubility es el nitrógeno soluble; HMW: nitrógeno soluble en la fracción peptídica de alto peso molecular; LMW: nitrógeno soluble en la fracción peptídica de bajo peso molecular.*

En relación con las diferencias en la **cinética de degradación entre alimentos**, Boisen & Fernández (1997) señalaron que la **etapa gástrica** tiene un impacto más significativo en las **fuentes proteicas**, mientras que los **cereales** son más influenciados por la etapa enzimática con **pancreatina**. Esta diferencia se atribuye principalmente a la **capacidad buffer** de los ingredientes y a su **resistencia a la acidez gástrica** (Figura N.º 9).

La **tercera etapa de incubación**, correspondiente a la fermentación, tiene mayor impacto en aquellos ingredientes con alta **capacidad fermentativa en el intestino grueso**, aunque su contribución a la **digestibilidad total** es limitada. Estos ingredientes suelen tener un mayor contenido de **fibra**, especialmente con enlaces **β-glicosídicos**, que no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas. También incluyen estructuras **resistentes a la digestión enzimática**, como las **dextrinas**, presentes en alimentos con alto contenido de **almidón vítreo**.

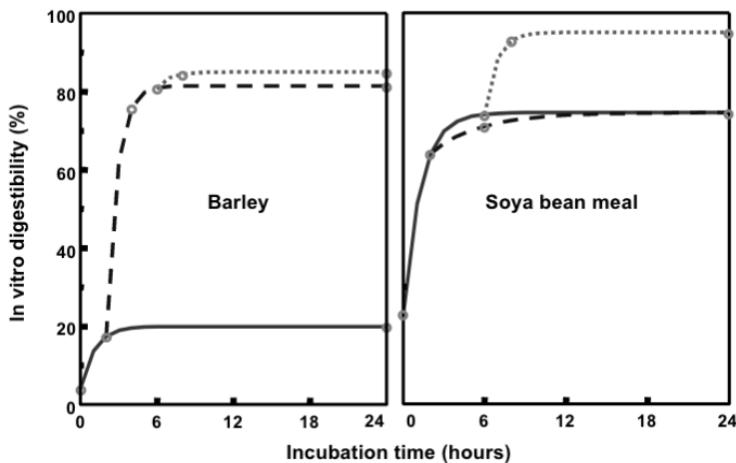


Figura N.º 8: Perfiles de degradación de la materia seca de alimentos contrastantes después de cada etapa de incubación.

Tomado de: Boisen y Fernández 1997

## DIGESTIBILIDAD IN VIVO E IN VITRO EN CERDOS EN CRECIMIENTO

En las **Tablas N.º 6, 7 y 8** se presentan los valores de digestibilidad obtenidos **in vivo** e **in vitro** en cerdos en crecimiento, según lo reportado por Son et al. (2024). El estudio comparó dos métodos: el protocolo de referencia y una variante con **incubación múltiple en bolsas selladas tipo F-57 ANKOM**.

La principal diferencia entre ambos métodos radica en que el segundo utiliza bolsas colocadas en un **agitador orbital (Daisy II)**, lo que permite realizar múltiples **incubaciones simultáneamente**, mejorando la **eficiencia operativa y la repetibilidad experimental**.

Tabla N.º 3: Digestibilidad de la materia seca *in vivo* en cerdos en crecimiento e *in vitro* por dos métodos diferentes.

| Categoría           | M     | SBM   | RSM   | DDGS  | WB    | GF    | SBP   | SH    | Método         |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| <b>Dieta</b>        | 89,60 | 88,50 | 82,50 | 84,10 | 82,00 | 79,60 | 84,30 | 84,90 | <i>In vivo</i> |
| <b>Dieta</b>        | 83,00 | 86,80 | 78,90 | 75,20 | 77,70 | 71,30 | 81,50 | 74,90 | Referencia     |
| <b>Dieta</b>        | 88,70 | 90,70 | 85,60 | 81,50 | 81,60 | 80,40 | 85,10 | 79,40 | Daisy II       |
| <b>Ingredientes</b> | 89,40 | 85,50 | 66,50 | 71,80 | 64,10 | 57,90 | 72,30 | 74,50 | <i>In vivo</i> |
| <b>Ingredientes</b> | 84,70 | 91,10 | 77,60 | 62,30 | 62,60 | 63,40 | 79,70 | 52,90 | Referencia     |
| <b>Ingredientes</b> | 88,00 | 91,60 | 77,80 | 66,00 | 63,50 | 62,10 | 80,20 | 54,10 | Daisy II       |

Tomado de (Son et al., 2024). C: Maíz; SBM: Harina de soja; DDGS: Residuos secos de destilería; WB: Tercerillas de trigo; GF: Gluten feed; SBP: Pulpa de remolacha.

Tabla N.º 4: Digestibilidad de la materia orgánica *in vivo* en cerdos en crecimiento e *in vitro* por dos métodos diferentes.

| Categoría    | M     | SBM   | RSM   | DDGS  | WB    | GF    | SBP   | SH    | Método         |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| Dieta        | 91,00 | 90,40 | 85,00 | 85,40 | 83,70 | 81,80 | 86,10 | 86,20 | <i>In vivo</i> |
| Dieta        | 82,70 | 86,70 | 79,50 | 75,10 | 77,50 | 71,40 | 81,80 | 74,90 | Referencia     |
| Dieta        | 88,70 | 90,80 | 85,80 | 81,10 | 81,10 | 80,10 | 84,90 | 78,90 | Daisy II       |
| Ingredientes | 90,80 | 88,30 | 70,30 | 64,00 | 66,40 | 60,50 | 74,60 | 75,20 | <i>In vivo</i> |
| Ingredientes | 83,60 | 90,50 | 79,10 | 61,90 | 62,30 | 62,50 | 80,50 | 53,40 | Referencia     |
| Ingredientes | 87,90 | 91,60 | 78,40 | 65,10 | 63,40 | 60,30 | 80,30 | 53,00 | Daisy II       |

Tomado de (Son et al., 2024). C: Maíz; SBM: Harina de soja; DDGS: Residuos secos de destilería; WB: Tercerillas de trigo; GF: Gluten feed; SBP: Pulpa de remolacha.

### Digestibilidad de la proteína bruta

La Tabla N.º 8 presenta los valores de digestibilidad de la **proteína bruta** para distintos ingredientes y dietas evaluados *in vivo* en cerdos en crecimiento. Se observa una variabilidad importante entre ingredientes, destacándose la **harina de soja (SBM)** con valores superiores al 90 %, mientras que ingredientes fibrosos como la **pulpa de remolacha (SBP)** y el **gluten feed (GF)** presentan valores considerablemente más bajos, especialmente en forma de ingrediente individual (Son et al., 2024).

Tabla N.º 5: Digestibilidad de la proteína cruda *in vivo* para cerdos en crecimiento.

| Categoría    | M     | SBM   | RSM   | DDGS  | WB    | GF    | SBP   | SH    | Método         |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| Dieta        | 80,50 | 90,30 | 83,90 | 86,00 | 85,10 | 83,10 | 78,90 | 76,30 | <i>In vivo</i> |
| Ingredientes | 80,40 | 91,30 | 78,90 | 82,60 | 76,30 | 74,60 | 50,70 | 36,00 | <i>In vivo</i> |

Tomado de (Son et al., 2024). C: Maíz; SBM: Harina de soja; DDGS: Residuos secos de destilería; WB: Tercerillas de trigo; GF: Gluten feed; SBP: Pulpa de remolacha.

La Tabla N.º 9 muestra los resultados de digestibilidad **in vitro (CIVID)** para **maíz (M)** y **harina de soja (SBM)**, considerando distintos **niveles de enzimas digestivas** (bajo y alto) y la aplicación o no de **corrección por blanco**.

En ambos ingredientes se observan **efectos significativos del nivel enzimático**, así como de la **corrección por blanco**, tanto en la **materia seca (MS)** como en la **proteína bruta (PB)**. En el caso del maíz, la digestibilidad de PB fue particularmente sensible al ajuste por blanco, alcanzando valores máximos con **alta dosis enzimática** y

**corrección aplicada** (0.940). Para la harina de soja, los valores fueron más estables, aunque también se incrementaron con la corrección (Song et al., 2024).

*Tabla N.º 6: Efecto de la corrección por blanco para materia seca y proteína bruta en maíz y harina de soja.*

| Dosis               | Bajo   |        |        |        | SEM  | P-value<br>Enzima | P-value<br>Corrección | P-value<br>Interacción |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|------|-------------------|-----------------------|------------------------|
|                     | Alto   |        |        |        |      |                   |                       |                        |
| Corrección          | Sin    | Con    | Sin    | Con    | SEM  | P-value<br>Enzima | P-value<br>Corrección | P-value<br>Interacción |
| <b>IVD MS (M)</b>   | 0.827c | 0.830c | 0.854b | 0.874a | 0,00 | 0,01              | <b>&lt;0.001</b>      | 0,04                   |
| <b>IVD PB (M)</b>   | 0.754c | 0.788b | 0.692d | 0.940a | 0,00 | <b>&lt;0.001</b>  | <b>&lt;0.001</b>      | <0.001                 |
| <b>IVD MS (SBM)</b> | 0,77   | 0,77   | 0,78   | 0,80   | 0,01 | 0,23              | 0,04                  | 0,35                   |
| <b>IVD PB (SBM)</b> | 0.915b | 0.917b | 0.925b | 0.965a | 0,00 | <b>&lt;0.001</b>  | <b>&lt;0.001</b>      | <0.001                 |

Tomado de (Song et al., 2024). IVD: Digestibilidad in vitro; Bajo: bajo nivel de enzima 0,01 g pepsina + 0,05 g pancreatina; Alto: alto nivel de enzima 0,2 g pepsina + 0,2 g pancreatina. Método de referencia.

### Digestibilidad del almidón

En monogástricos, la **digestibilidad del almidón** suele ser **muy elevada**, y en la mayoría de los casos se considera **casi completa**. Sin embargo, una fracción del almidón **escapa a la digestión en el intestino delgado**, llegando al intestino grueso donde puede ser fermentado, lo que representa una pérdida de eficiencia energética.

En la Tabla N.º 10 se presentan los valores de **digestibilidad ileal del almidón** obtenidos **in vivo** en cerdos en crecimiento, para distintos cereales, junto con su contenido de **almidón digestible en base seca** (Rosenfelder-Kuon et al., 2017).

**Similares valores de digestibilidad del almidón** se obtienen en **broilers**. En la siguiente tabla (Tabla N.º 11) se presentan los valores para **dietas experimentales** (Weurding et al., 2001).

*Tabla N.º 7: Digestibilidad ileal del almidón in vivo en cerdos en crecimiento para diferentes cereales.*

| Ítem   | Cebada | Centeno | Triticale | Trigo |
|--|--------|---------|-----------|-------|
| <b>Digestibilidad ileal del almidón %</b>      | 92.5a  | 94.9b   | 97.3c     | 92.2a |
| <b>Contenido de almidón digestible ileal %</b> | 57.6a  | 61.1b   | 68.3d     | 66.1c |

Tomado de (Rosenfelder-Kuon et al., 2017).

*‘Tabla N.º 8: Digestibilidad del almidón en broilers para diferentes cereales y segmentos del intestino delgado.*

| Ingrediente                    | Yeyuno posterior | Íleon anterior | Íleon posterior | Total  |
|--------------------------------|------------------|----------------|-----------------|--------|
| <b>Trigo</b>                   | 88.2ef           | 92.9d          | 94.4d           | 93.8d  |
| <b>Maíz (molino martillos)</b> | 88.8fg           | 95.3e          | 96.9ef          | 97.4fg |
| <b>Maíz (molino rodillos)</b>  | 91.3g            | 96.6f          | 97.4f           | 97.7g  |
| <b>Cebada</b>                  | 89.8fg           | 97.3g          | 98.1g           | 98.3h  |
| <b>Sorgo</b>                   | 83.7d            | 93.0d          | 95.3d           | 95.4e  |
| <b>Almidón de patata</b>       | 19.8a            | 25.3a          | 32.9a           | 31.7a  |
| <b>Arroz no pulido</b>         | 85.1de           | 94.8e          | 96.8e           | 97.3f  |
| <b>Pooled SD</b>               | 4,20             | 2,70           | 1,70            | 1,60   |

*Tomado de (Weurding et al., 2001).*

#### Relación amilosa : amilopectina

Un **incremento en la relación amilosa:amilopectina** se asocia con una **disminución en la digestibilidad ileal del almidón**. En este sentido, Li et al. (2015) reportaron una **reducción del 3,25 %** en cerdos alimentados con **maíz molido** y de **3,82 %** con **maíz extrusionado**, al aumentar la relación de **0,39 a 0,60** en **lechones destetados de 13 kg** de peso vivo.

Además, los autores observaron una **relación lineal inversa** entre esta proporción y el contenido de **almidón resistente**, como se muestra en la Tabla N.º 12.

*Tabla N.º 9: Efecto de la relación amilosa:amilopectina del almidón al variar condiciones de almacenamiento.*

| Ítem              | Ratio | H (%) | S. 0 | S. 1 | S. 2 | S. 3 | S. 4 | SEM   | V     | H     | D     | V × H | V × D | H × D | V × H × D |
|-------------------|-------|-------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| Almidón Resist. % | LA    | 50    | 1,03 | 1,32 | 1,66 | 1,75 | 1,79 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01     |
|                   |       | 80    | 1,01 | 1,40 | 1,83 | 2,09 | 2,16 |       |       |       |       |       |       |       |           |
|                   | I     | 50    | 1,12 | 1,47 | 2,88 | 2,34 | 2,16 |       |       |       |       |       |       |       |           |
|                   |       | 80    | 1,11 | 1,54 | 2,58 | 2,84 | 3,05 |       |       |       |       |       |       |       |           |
|                   | HA    | 50    | 1,24 | 1,70 | 2,35 | 2,38 | 2,47 |       |       |       |       |       |       |       |           |
|                   |       | 80    | 1,26 | 1,81 | 2,68 | 3,19 | 3,37 |       |       |       |       |       |       |       |           |
| Digest. Almidón % | LA    | 50    | 96,3 | 92,4 | 92,2 | 91,5 | 91,4 | 0,14  | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | 0,31      |
|                   |       | 80    | 95,6 | 91,1 | 90,9 | 90,5 | 91,4 |       |       |       |       |       |       |       |           |
|                   | MA    | 50    | 93,2 | 91,0 | 91,4 | 90,3 | 89,1 |       |       |       |       |       |       |       |           |
|                   |       | 80    | 93,0 | 89,2 | 89,1 | 88,5 | 88,4 |       |       |       |       |       |       |       |           |
|                   | HA    | 50    | 92,5 | 90,4 | 89,3 | 88,1 | 87,9 |       |       |       |       |       |       |       |           |
|                   |       | 80    | 92,1 | 87,9 | 86,7 | 85,7 | 85,4 |       |       |       |       |       |       |       |           |

*Tomado de (Li et al., 2015). Donde: LA = bajo (0.39) AM:AP ratio; MA = medio (0.44); HA = Alto (0.60).H: Humedad %; S: Semana; V: efecto de la variedad del maíz; D: efecto de la duración del almacenamiento.*

## DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA IN VIVO E IN VITRO EN LECHONES

Cho & Kim (2011) evaluaron dietas formuladas para lechones de **12 kg de peso vivo**, comparando los resultados obtenidos mediante el método **in vitro** de Boisen & Fernández (1997) con aquellos registrados **in vivo** en animales con **cánula ileal**.

Los autores concluyeron que los valores de digestibilidad **in vitro** tienden a estar **sobreestimados** para la **materia seca**, la **proteína bruta** y los **aminoácidos** (Tabla N.º 13). Esta discrepancia se atribuye a la ausencia de **pérdidas endógenas** en los ensayos **in vitro**, las cuales tienen un **impacto** considerable a **nivel ileal**.

En cuanto a los **aminoácidos**, el ajuste necesario fue mayor para los **esenciales** que para los **no esenciales**; posiblemente debido a una **mayor variabilidad** en las **pérdidas endógenas** observadas **in vivo**.

Aunque los resultados sugieren que el método **in vitro** posee potencial, los autores señalan la **necesidad de introducir modificaciones metodológicas para mejorar su exactitud** en categorías fisiológicas limitadas como en los lechones al destete.

*Tabla N.º 10: Comparación de la digestibilidad *in vivo* e *in vitro* de la proteína bruta y aminoácidos en lechones destetados.*

| Ítem (%)             | in vitro | in vivo | EE   |
|----------------------|----------|---------|------|
| <b>PB</b>            | 91,25    | 84,61   | 2,34 |
| <b>Esenciales</b>    |          |         |      |
| Arg                  | 90,25    | 80,97   | 3,25 |
| His                  | 87,60    | 78,82   | 2,14 |
| Lle                  | 93,82    | 84,75   | 2,52 |
| Leu                  | 91,71    | 83,10   | 4,05 |
| Lys                  | 94,56    | 82,44   | 3,02 |
| Met                  | 90,88    | 81,53   | 2,09 |
| Phe                  | 87,21    | 78,47   | 3,44 |
| Thr                  | 89,20    | 76,43   | 3,80 |
| Val                  | 92,77    | 80,83   | 2,99 |
| <b>No esenciales</b> |          |         |      |
| Ala                  | 91,68    | 81,00   | 2,95 |
| Asp                  | 90,56    | 82,96   | 3,02 |
| Cys                  | 92,38    | 79,96   | 2,44 |
| Glu                  | 90,81    | 80,20   | 4,56 |
| Gly                  | 89,54    | 77,74   | 4,01 |
| Pro                  | 89,76    | 74,48   | 2,10 |
| Ser                  | 91,79    | 77,21   | 2,74 |
| Tyr                  | 92,76    | 80,82   | 2,56 |

*Tomado de (Cho & Kim, 2011).*

## DESARROLLO ENZIMÁTICO

El **desarrollo enzimático inmaduro** en lechones postdestete limita la eficiencia digestiva, especialmente en lo que respecta a **proteínas de origen vegetal** y **carbohidratos amiláceos**, lo cual impacta negativamente en el **rendimiento productivo**.

La mayoría de las enzimas digestivas alcanzan su **nivel máximo de actividad hacia la séptima semana de vida**. Además, algunas enzimas presentes en etapas tempranas no se encuentran en animales adultos, lo que evidencia un perfil enzimático transicional durante esta fase crítica del desarrollo (Hartman et al., 1961).

Este retraso en la maduración enzimática condiciona una **baja utilización de nutrientes**, en particular **proteínas y carbohidratos**. A ello se suma el efecto del **ritmo de tránsito digestivo**, que influye directamente sobre la digestibilidad al interactuar con la **naturaleza del alimento** y la **capacidad de absorción intestinal** (Hartman et al., 1961).

Por otro lado, Efird et al. (1982) observaron que los lechones destetados presentan un **pH gástrico más elevado** que el óptimo para la actividad de la **pepsina**, lo que **compromete la digestión de proteínas en el estómago**. Este parámetro sufre **cambios drásticos entre la segunda y tercera semana de vida**, lo cual contribuye a un rendimiento **subóptimo** en esta etapa.

## DIGESTIÓN EN ESTÓMAGO E INTESTINO DELGADO

Cranwell P.D. (1985) reportó que **lechones alimentados exclusivamente con leche** presentan un **nivel máximo de ácido clorhídrico (HCl)** de **5,2 µmol/g** de peso estomacal (10–26 g). Sin embargo, cuando los animales reciben **creep feed** entre los días 12 y 21 de vida, la secreción de HCl aumenta a **7,9 µmol/g**, con un peso estomacal de 20 a 40 g. Estas diferencias se incrementan con la edad, de 32 % a las 3 semanas alcanzando un **49 % más de secreción** a las seis.

En el mismo estudio, se midió la **actividad de pepsina** en intervalos de 15 minutos. A los 30 minutos tras la alimentación, los lechones alimentados con leche alcanzaron una secreción de **0,31 U/g** de estómago, mientras que aquellos con creep feed alcanzaron **0,5 U/g** (Figura N.º 11, paneles b y c).

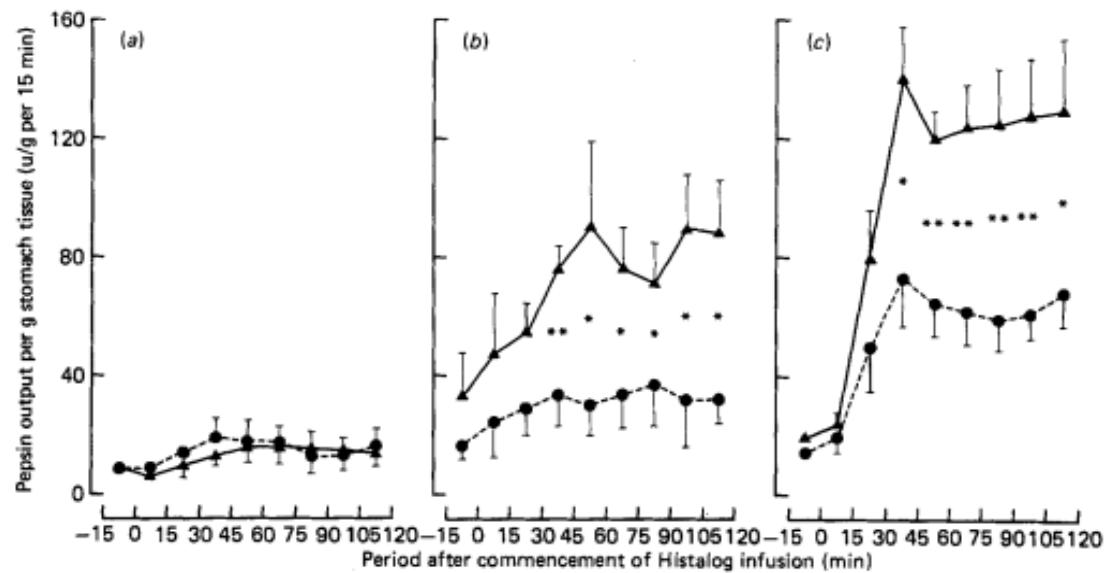


Figura N.º 9: Evolución de la secreción de pepsina pos-infusión para tres edades diferentes.

Tomado de (P. D. Cranwell, 1985) Análisis de actividad enzimática (EC 3.4.23.1) Unidades TAME/g de peso de estómago; a) 9-12 días edad; b) 18-21 d; c) 27-38d.

Según Cranwell & Moughan (1989), la **actividad de pepsina** y la **secreción ácida** están **estrechamente relacionadas con la edad y el consumo de alimento sólido**. Las unidades de actividad enzimática se expresan como hidrólisis bajo condiciones estándar (Tabla N.º 14).

Tabla N.º 11: Actividad de pepsina según edad en lechones al destete.

| Edad    | Actividad de pepsina |
|---------|----------------------|
| 9-12 d  | 0,16 KU / 15'        |
| 18-21 d | 0,7 KU / 15'         |
| 27-38 d | 1,08 KU / 15'        |

Tomado de (Cranwell & Moughan, 1989). Actividad enzimática (EC 3.4.23.1)

El **subdesarrollo del sistema digestivo** en lechones postdestete tiene implicancias directas sobre el **rendimiento y la susceptibilidad a trastornos digestivos**. La transición de una **dieta líquida** de alta digestibilidad a una **dieta sólida**, rica en **ingredientes vegetales**, demanda una **adaptación estructural y funcional** del tracto gastrointestinal (TGI) (Ospinal et al., 2011).

Esta adaptación implica cambios morfológicos, como la **reducción de la relación vellosidad-cripta** en el intestino delgado, con **acortamiento de las vellosidades** e hiperplasia de criptas, afectando negativamente la absorción (Xu et al., 2000).

Asimismo, se observa una marcada **disminución de la actividad de lactasa**, principalmente por la falta de sustrato y el deterioro estructural de las vellosidades. También se ve afectada la actividad de otras enzimas, como la **sacarasa**, debido al menor desarrollo de la superficie absortiva (Hampson & Kidder, 1986).

La **actividad enzimática pancreática** y la de sus cofactores sufre su mayor disminución entre los **días 3 y 5 postdestete** (Hedemann & Jensen, 2004; Tabla N.º 15, Figura N.º 12). Similar tiempo para las enzimas presentes en el borde de la barrera intestinal, en esta el proceso está ligado al tiempo requerido para la **diferenciación de enterocitos**, que se generan en la cripta y migran hacia la vellosidad, donde finalmente expresan su funcionalidad completa (Hampson & Kidder, 1986).

En un estudio comparativo, Lecce et al. (1983) observaron que lechones alimentados en **tres tomas diarias con gran volumen** presentaron mayor incidencia de **diarreas** que aquellos alimentados en **24 tomas diarias**, lo que resalta el efecto del patrón de alimentación sobre la salud intestinal.

Tabla N.º 12: Evolución de la actividad enzimática pre y post destete en lechones.

| Día            | Tripsina | IC           | Quimiotripsina | IC         | Amilasa | IC          |
|----------------|----------|--------------|----------------|------------|---------|-------------|
| <b>-3</b>      | 4,48abc  | (2,84-7,07)  | 457ab          | (260-805)  | 2051ab  | (1243-3385) |
| <b>0</b>       | 5,28ab   | (3,35-8,32)  | 713a           | (405-1254) | 2712a   | (1643-4476) |
| <b>1</b>       | 7,94a    | (4,88-12,92) | 676a           | (384-1190) | 2383a   | (1444-3933) |
| <b>2</b>       | 4,98ab   | (3,16-7,85)  | 300bc          | (170-527)  | 1765abc | (1069-2913) |
| <b>3</b>       | 2,49cd   | (1,58-3,93)  | 145cd          | (80-266)   | 953cd   | (577-1573)  |
| <b>5</b>       | 2,10d    | (1,33-3,31)  | 140cd          | (80-246)   | 672d    | (407-1109)  |
| <b>7</b>       | 4,34abc  | (2,75-6,84)  | 120d           | (66-220)   | 1169bcd | (708-1930)  |
| <b>9</b>       | 3,07bcd  | (1,95-4,83)  | 105d           | (58-192)   | 1089bcd | (660-1798)  |
| <b>p-value</b> | 0,0036   |              | <0,0001        |            | 0,0018  |             |

Tomado de: (Hedemann & Jensen, 2004).

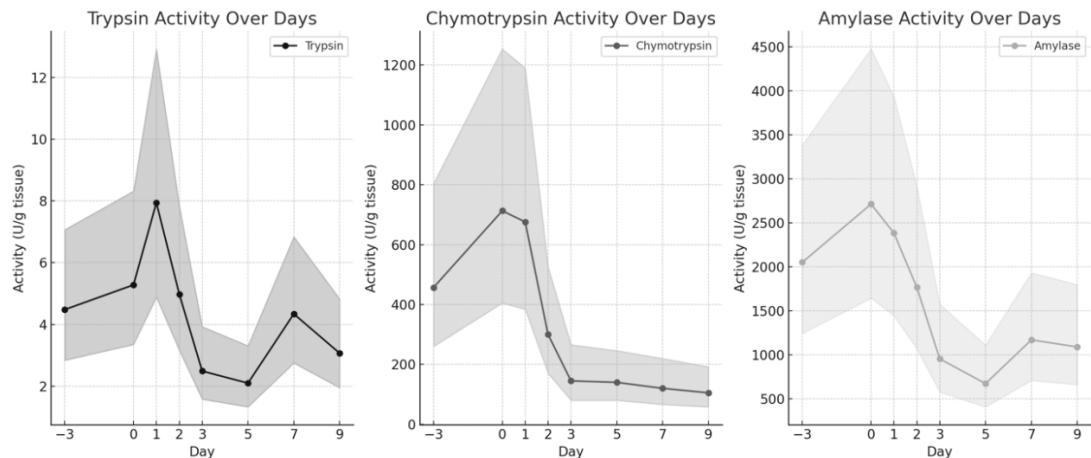


Figura N.º 10: Evolución de la actividad enzimática pre y post destete en lechones.

Adaptado de (Hedemann & Jensen, 2004)

Owsley et al. (1986) señalaron que, si bien se requieren aproximadamente **dos semanas** para **recuperar la actividad enzimática tras el destete**, este proceso depende de la **fuente proteica** y del **nivel de consumo**. También reportaron que la **digestibilidad del nitrógeno** es del **98 % en leche** y del **82 % en dietas con harina de soja**. Para la **materia seca**, los valores fueron de **82 % y 64 %**, respectivamente.

Según Hedemann & Jensen (2004), la **actividad enzimática** digestiva varía según la porción intestinal y los días postdestete. Aunque no se encontraron diferencias significativas para **tripsina** y **amilasa**, se observó una **tendencia a la baja en la actividad de quimiotripsina y lipasa**, especialmente en la región proximal del intestino delgado ( $p = 0,1$  para tripsina) (Figura N.º 13).

Tradicionalmente, la estrategia para reducir el riesgo de colonización por bacterias patógenas ha sido **mejorar la digestibilidad de la dieta** y usar **antimicrobianos**. Sin embargo, esto no siempre ha resultado eficaz para prevenir **diarreas postdestete** (Molist et al., 2014).

En este contexto, el **incremento de costos** ha incentivado el uso de **ingredientes más económicos** y la inclusión de **fuentes de fibra funcional**, las cuales pueden actuar como **moduladores del desarrollo digestivo** y mejorar la funcionalidad del TGI (Molist et al., 2014).

Finalmente, factores como la **viscosidad de la digesta** y el **tamaño de partícula** influyen directamente en el **pH gástrico**, el **vaciamiento estomacal** y la **eficiencia de absorción intestinal** (Bornhorst et al., 2013; Danicke et al., 1999)

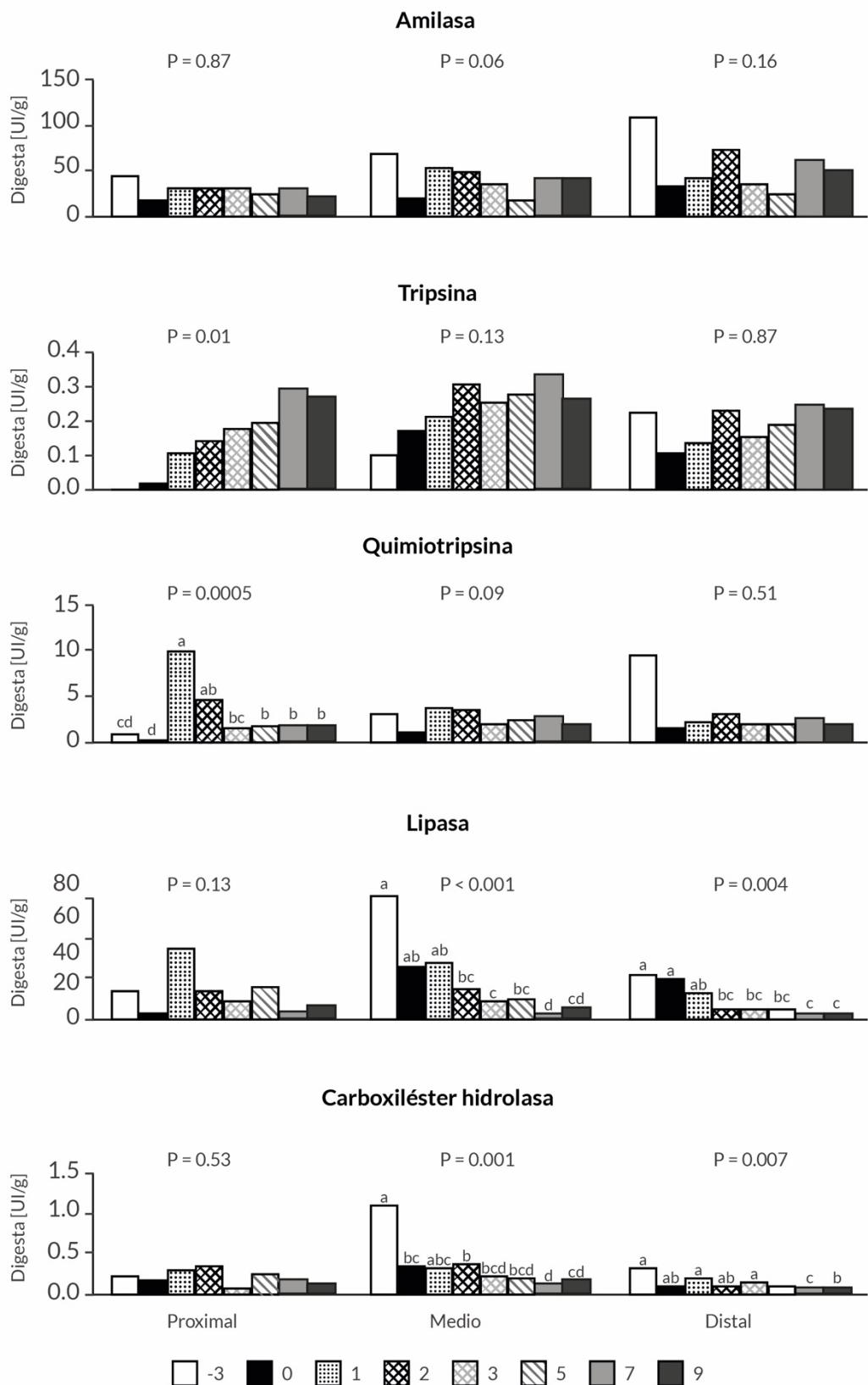


Figura N.º 11: Actividad enzimática medida antes y post destete.

Tomado de: Hedemann & Jensen (2004)

## EFFECTO DE LA FIBRA SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA

La **digestibilidad ileal aparente** (AID) de la proteína se ve afectada negativamente por el **contenido total de fibra dietaria** (TDF). Tanto la **fibra soluble** (SDF) como la **insoluble** (IDF) pueden reducir la AID e incrementar las **pérdidas endógenas**, aunque lo hacen mediante mecanismos fisiológicos distintos.

La **fibra insoluble** actúa principalmente **encapsulando la proteína** dentro de la **matriz celular**, dificultando su acceso a las enzimas digestivas. En cambio, la **fibra soluble** ejerce su efecto a través del aumento de la **viscosidad intestinal** y la **disminución en la absorción de nutrientes**, lo que también favorece una **mayor excreción** de compuestos **nitrogenados endógenos**.

En la Figura N.º 10, se presenta un análisis de datos recopilados por Zhang et al. (2024), donde se analiza la relación entre distintas fracciones de fibra y la AID de la proteína en cerdos en crecimiento. Se diferencian dietas basadas en **cereales fibrosos** (Figura N.º 10 a–c) y **cereales no fibrosos** (Figura N.º 10 d–f), mostrando tendencias claras en la respuesta digestiva frente a cada tipo de fibra.

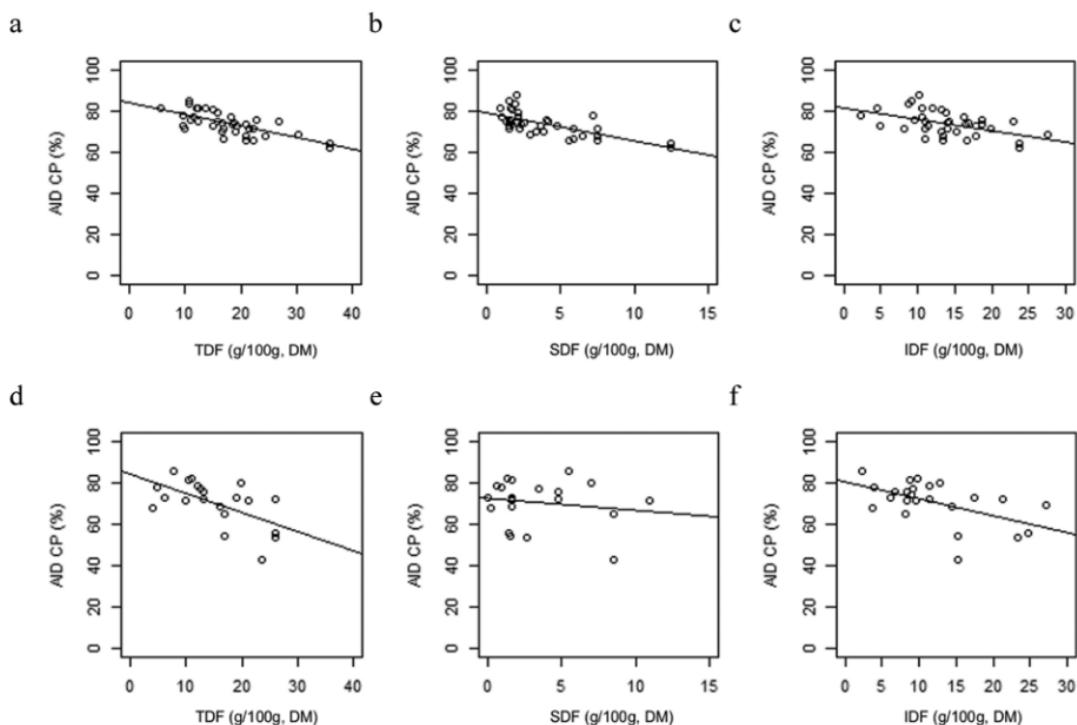


Figura N.º 12: Relación entre fibra dietaria total (TDF), soluble (SDF), insoluble (IDF) y la digestibilidad aparente de la proteína bruta.

Tomado de (Zhang et al., 2024).

## **OBJETIVOS**

La revisión bibliográfica pone de manifiesto que, tras el destete, el lechón se ve expuesto a limitaciones fisiológicas en su capacidad para acidificar el estómago, y en el potencial enzimático digestivo que puede comprometer su capacidad digestiva, tanto del almidón, como de la proteína. Partiendo de este escenario se plantaron los siguientes objetivos.

### **GENERALES**

Evaluar modificaciones a un **método de digestibilidad in vitro estandarizado**, con el fin de **ajustarlo a las condiciones fisiológicas** de lechones al destete y así obtener **estimaciones más representativas**.

Para ello, se analizarán los valores de digestibilidad in vitro de **materia seca**, **nitrógeno** y **almidón** aplicando tres variantes metodológicas, utilizando distintos ingredientes. Estos resultados se compararán con datos **in vivo** obtenidos previamente sobre los mismos alimentos.

### **ESPECIFICOS**

Evaluar el efecto de un **pH elevado** en la primera etapa de incubación con pepsina, simulando la **menor capacidad de secreción gástrica** observada en lechones al destete.

Analizar el impacto de la **reducción de enzimas digestivas** (pepsina y pancreatina) en comparación con el método de referencia, como simulación de la **baja actividad enzimática** documentada en esta categoría.

**Cuantificar el efecto** de estas modificaciones y su interacción, a través del **residuo seco no digerido** tras la incubación con pepsina y pancreatina, simulando la digestión a **nivel ileal**.

Determinar la digestibilidad de los **ingredientes proteicos** mediante la evaluación de **materia seca** y **nitrógeno**, y de los **cereales** a partir del contenido de **materia seca** y **almidón** en el residuo.

## **HIPOTESIS**

Es posible **simular in vitro la limitada capacidad digestiva** de lechones al destete mediante la **modificación de ciertos parámetros** del método de referencia.

En particular, el **incremento del pH** durante la etapa de incubación con **pepsina** representa un factor determinante en la digestibilidad de los **ingredientes proteicos**.

Asimismo, la **reducción del nivel de enzimas** digestivas en comparación con el método original mejora la estimación de la **digestibilidad de proteína y almidón**, aumentando su **correlación con los resultados obtenidos in vivo**.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TÉCNICA**

Las incubaciones se realizaron de forma múltiple en bolsas tipo **ANKOM F-57**, siguiendo el protocolo de Boisen y Fernández (1997) adaptado a un **incubador Daisy II (ANKOM)** con bolsas de **poliéster F-57 de 25 µm de poro**.

La muestra utilizada fue de **0,5 ± 0,01 gramos de peso fresco**, las bolsas tipo F-57 fueron lavadas previamente con **acetona al 99,5 %**, a fin de evitar la obstrucción de poros. Una vez selladas térmicamente y antes de la incubación, la muestra se **distribuyó cuidadosamente** dentro de cada bolsa para **favorecer el contacto con el medio de incubación**.

En la **etapa 1 de incubación**, se preparó un buffer **0,1 M pH 6.0**, del cual se utilizaron **25 mL por muestra**. A esta solución se le agregaron **10 mL de HCl 0,2 M**, ajustando el pH a **2.0**, y posteriormente se incorporó **1 mL de solución de pepsina** (25 mg/mL, porcina, **2000 FIP-U/g, Sigma Aldrich® N.º 7190**). Las muestras fueron incubadas durante **2 horas a 39 °C**, en el **incubador Daisy II**.

En la **etapa 2**, se añadieron **10 mL de buffer 0,2 M pH 6.8** y **5 mL de NaOH 0,6 M** por muestra. Luego de ajustar el pH a **6.8**, se agregó **1 mL de solución de pancreatina** (porcina, grade IV, **Sigma Aldrich® N.º P-1750 x4 USP**), previamente diluida en **agua destilada a 39 °C**, agitada durante **30 minutos** y centrifugada a **300 × g**. Las muestras fueron incubadas durante **4 horas a 39 °C**, luego de finalizado el tiempo se

procedió con **doble lavado con agua del grifo**, luego con **etanol (96 %)** y **acetona (99,5 %)**, y finalmente secado en estufa 12 horas a 103 °C. (ANEXO III.4 – Resultado post incubación de muestras de cereales)

#### Corrección por materia seca de bolsas

Se realizó la determinación de materia seca en un total de **10 bolsas tipo F-57**, registrando su peso **antes y después de 12 horas en estufa de aire forzado a 103 °C**. El valor promedio obtenido se utilizó para **corregir el peso de la bolsa sin secar**, de acuerdo con el protocolo establecido por **ANKOM** para incubaciones con bolsas F-57 en líquido ruminal utilizando el sistema **Daisy II**. Esta corrección fue aplicada sistemáticamente para ajustar los cálculos del residuo seco recuperado tras la digestión.

#### Correcciones por actividad enzimática

Se realizó un análisis de la **actividad enzimática real** de la **pepsina** y la **pancreatina** en un **laboratorio externo especializado**, utilizando los protocolos **EC 3.4.23.1** (para pepsina) y **EC 3.4.21.4** (para pancreatina). En función de los resultados obtenidos, se ajustaron las dosis de enzimas para igualar las **unidades de actividad teórica** requeridas por el protocolo de referencia y las **especificaciones nominales del fabricante**.

#### *Pepsina*

Según el protocolo de referencia, la solución de pepsina debe prepararse a una concentración de **25 mg/mL**, con una actividad de **2000 FIP-U/g** (MERCK 7190).

La conversión entre unidades establece que **1 FIP-U equivale a 0,7 IU**. El análisis realizado mediante el protocolo EC 3.4.23.1 arrojó una actividad enzimática de **3676,98 IU/mg** para el lote **BCCL5653 | Pcode: 102752438**, correspondiente a **Pepsina P7000 (Sigma-Aldrich)**.

Para alcanzar las **50.000 FIP-U totales por cada 0,5 g de muestra**, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{50.000 \text{ FIP-U}}{3.676,98 \text{ IU/mg} \times 0,7} = \frac{50.000}{2.573,89} = 19,43 \text{ mg/mL}$$

Dado que la actividad observada fue **superior a la estándar**, se utilizó **una menor cantidad de pepsina por mililitro**, manteniendo la carga total requerida.

La disolución de la pepsina se realizó el mismo día de la incubación, en **HCl 0,2 M**, a **temperatura ambiente**, con **agitación durante 25 minutos**.

#### *Pancreatina*

El protocolo de referencia establece una solución de **100 mg/mL de pancreatina grade IV** (Sigma P-1750 x4 USP), con equivalencia de **19,2 USP = 1 U-TAME**.

Se analizaron tres diferentes botes de pancreatina, cada uno empleado de forma independiente en su respectiva incubación. El lote **Pcode: 0000336285** presentó una actividad de **3,8025 U-TAME/mg** (bote E).

Para alcanzar las **100 USP por cada 0,5 g de muestra**, se realizó la siguiente conversión:

$$25 \text{ USP} \times 4 = 100 \text{ USP}$$

$$\frac{100}{19,2} = 5,2083 \text{ U-TAME}$$

$$\frac{520,83 \text{ U-TAME}}{3,8025 \text{ U/mg}} = 136,97 \text{ mg/mL}$$

Dado que esta concentración **superó los 100 mg/mL en algunos casos**, se optó por **incrementar el volumen total de solución** utilizada por muestra, manteniendo constante la **cantidad total de unidades enzimáticas**.

La disolución se preparó el mismo día de incubación en **agua destilada a 39 °C**, con **agitación durante 30 minutos**, seguida de **centrifugación a temperatura ambiente a 300 × g durante 10 minutos**.

## CONDICIONES DE INCUBACION

El objetivo de estos experimentos orientados **específicamente a responder las hipótesis planteadas** fue evaluar si modificando el **pH**, la **concentración enzimática** y manteniendo constante el **tiempo de incubación**, es posible obtener valores de digestibilidad más representativos para **materia seca (MS)**, **proteína bruta (PB)** y **almidón (A)**, mejor correlacionados con los valores **in vivo** obtenidos previamente.

Los experimentos fueron planteados como **dos incubaciones diferenciadas**, una para **cereales** y otra para **fuentes proteicas**, utilizando un **diseño de bloques completos al azar**, con los **alimentos como bloques** y los **métodos de incubación como tratamientos**. Cada alimento se evaluó con **cuatro repeticiones**, permitiendo así el análisis estadístico robusto de los efectos del método.

Los tratamientos (métodos) fueron definidos con base en el contraste entre **actividad enzimática**, **pH** y el mantenimiento del **tiempo de incubación**, tomando como referencia el protocolo estándar de **Boisen & Fernández (1997)**. Para cada tratamiento se incorporó un **blanco sin muestra**, con el propósito de corregir los valores de **materia seca y nitrógeno** derivados exclusivamente de las enzimas y del medio de incubación.

Los ingredientes utilizados fueron los mismos que en los ensayos *in vivo* de los que se extrajeron los coeficientes de digestibilidad. Para los cereales, se seleccionaron **maíz (M)**, **trigo (T)**, **cebada (C)** y **cebada extrusionada (CE)**, dada su **diversidad en estructura de almidón y contenido de fibra**. En cuanto a las fuentes proteicas, se utilizaron: **harina de soja (SBM)**, concentrado de **harina de girasol (SFM)**, **harina de colza (RSM)** y **concentrado de SBM (ASOY) (Alpha Soy ® AB-NEO (AB-Agri))**.

### Tratamientos

Se establecieron **cuatro tratamientos**, a partir del **método estándar (STD)**, modificando dos variables clave: el **pH de la primera etapa**, que se elevó de **2.0 a 4.0** para simular la **baja capacidad de acidificación** en lechones al destete, y la **reducción de la concentración enzimática** al **50 %** de lo indicado en el protocolo, tanto para **pepsina** como para **pancreatina**. El **tiempo de incubación** de ambas etapas se mantuvo constante. Los detalles de todos los parámetros se presentan en la siguiente tabla (Tabla N.º 16).

Los tratamientos fueron los siguientes:

- i) **Standard (STD):** protocolo original de Boisen & Fernández (1997)
- ii) **Alternativo A (ALT-A):** pH bajo (2.0), baja concentración enzimática
- iii) **Alternativo B (ALT-B):** pH alto (4.0), alta concentración enzimática
- iv) **Alternativo C (ALT-C):** pH alto (4.0), baja concentración enzimática

*Tabla N.º 13: Condiciones de incubación para los protocolos propuestos y el de referencia.*

|                                  | STD (D)                                   | ALT A                                    | ALT B                                     | ALT C                                    |
|----------------------------------|---|--|---|--|
|                                  | Bajo pH                                   |  |   | Alto pH                                  |
| <b>Fase 1</b>                    | Alto [E]                                  | Bajo [E]                                 | Alto [E]                                  | Bajo [E]                                 |
| pH                               | 2.0                                       | 2.0                                      | 4.0                                       | 4.0                                      |
| Nivel de enzima [E]              | 100% 25 mg<br>50.011 FIP-U<br>71.444 IU   | 50% 12,5 mg<br>25.005 FIP-U<br>35.722 IU | 100% 25 mg<br>50.011 FIP-U<br>71.444 IU   | 50% 12,5 mg<br>25.005 FIP-U<br>35.722 IU |
| Actividad enzimática (calculado) |   |  |   |  |
| Temperatura                      | 39 ° C                                    |  |   |  |
| Time                             | 2 horas                                   |  |   |  |
| <b>Fase 2</b>                    |   |  |   |  |
| pH                               | 6.8                                       |  |   |  |
| Nivel de enzima [E]              | 100%   100 mg<br>520 U-TAME<br>10.000 USP | 50%   50mg<br>260 U-TAME<br>5.000 USP    | 100%   100 mg<br>520 U-TAME<br>10.000 USP | 50%   50 mg<br>260 U-TAME<br>5.000 USP   |
| Actividad enzimática (calculado) |   |  |   |  |
| Temperatura                      | 39 ° C                                    |  |   |  |
| Time                             | 4 horas                                   |  |   |  |

### Variables analizadas

Las variables analizadas fueron: **materia seca (MS %)**, **proteína bruta (PB %)**—calculada como **N % × 6,25**— y **almidón (A %)**. Cada bolsa fue **secada en estufa**, y se registró el **peso sin abrir**, calculando el **residuo por diferencia**. Este valor se **corrigió por la humedad inicial** mediante una muestra representativa de cada ingrediente.

El cálculo de la **digestibilidad in vitro (IVD)** para cada nutriente se realizó siguiendo la ecuación propuesta por Ha et al. (2020) y Son & Kim (2023), incorporando además la **corrección por el blanco enzimático**:

$$\text{IVD-MS (\%)} = \frac{(\text{MS inicial} - \text{MS final} + \text{MS blanco})}{\text{MS inicial}} \times 100$$

En el caso de la **digestibilidad del nitrógeno (IVD-PB)**, el análisis se realizó utilizando **la bolsa completa como muestra**, a pesar de que, según el fabricante, las bolsas son **libres de nitrógeno**. Se incorporaron igualmente **blancos de bolsas sin muestra** para confirmar esta condición, y su contenido de nitrógeno resultó **despreciable**.

La fórmula aplicada tanto para **nitrógeno (N)** como para **almidón (A)** fue la siguiente:

$$\text{IVD-N (\%)} = \frac{([N] \times \text{MS inicial} - [N] \times \text{MS final} + [N] \times \text{MS Blanco})}{[N] \times \text{MS inicial}} \times 100$$

Para la determinación de **almidón**, se agruparon **dos bolsas por muestra**, el criterio determinado fue el de agrupar de a pares por cantidad de residuo final (2 de baja y 2 de alta residuo). El análisis utilizado fue el **método enzimático de almidón** y se realizó por **separado de la bolsa**, requiriendo la **extracción del residuo controlando mediante el peso pre y post recolección** y así **evitar las pérdidas de residuo adheridos a la bolsa**. El cálculo de esta se realizó de la misma manera que para el nitrógeno.

### Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados conforme al **diseño experimental propuesto**, siendo la **unidad experimental cada bolsa incubada**. Los modelos estadísticos utilizados se detallan a continuación.

Las medias fueron comparadas mediante **contrastos dirigidos**, con el objetivo de evaluar los **efectos de los tratamientos alternativos respecto al método de referencia**, utilizando un **nivel de significancia  $\alpha = 0,05$** .

Posteriormente, se realizó una **comparación directa** entre los **valores de digestibilidad in vitro** y los **valores de digestibilidad ileal in vivo**, obtenidos en los experimentos previos.

Ambos análisis incluyeron la evaluación de la **interacción entre bloques (tipo de alimento: cereal vs. proteico) y tratamientos (métodos)**, con el objetivo de detectar posibles **diferencias en la respuesta digestiva** según el tipo de ingrediente.

Se optó por dos enfoques, por un lado, un análisis directo a visualizar el coeficiente de digestibilidad de cada tratamiento e ingrediente, y otro a evaluar los efectos de las condiciones alteradas sobre los ingredientes.

*Modelo general del experimento (DBCA) (evalúa el método per se)*

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_j + \varepsilon_{ijk}$$

$$\begin{aligned} i &= A; B; C; D \\ j &= M, T, C, CE, SBM, aSOY, RSM, SFM \\ k &= 1, 2, 3, 4 \end{aligned}$$

$Y_{ijk}$ : variable de respuesta

$\mu$ : media de la población

$\beta_i$ : efecto del  $i$ -esimo bloque (M, T, C, CE, SBM, aSOY, RSM, SFM)

$\tau_j$ : efecto del  $j$ -esimo tratamiento (A, B, C, D)

$\varepsilon_{ijk}$ : es el error experimental

*Juego de hipótesis estadísticas*

Sobre los efectos principales

$$H_0: D = A = B = C$$

$$H_a: \text{Existe al menos una diferencia}$$

Respecto al testigo (T)

$$H_0: T = D = A = B = C$$

$$H_a: T \neq D \neq A \neq B \neq C$$

$$H_a: T > o < D; A; B; C$$

Modelo factorial en bloques del experimento (evalúa los efectos dentro del método)

$$Y_{ijkl} = \mu + I_k + A_i + B_j + (AB)_{ij} + (IA)_{ki} + (IB)_{kj} + (IAB)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

$i$  = pH bajo, pH alto  
 $j$  = [E alta], [E baja]  
 $k$  = M, T, C, CE, SBM, aSOY, RSM, SFM  
 $l$  = repetición 1, 2, 3, 4

$Y_{ijk}$  : Variable respuesta

$\mu$  : Media poblacional

$\beta_k$  : Efecto del ingrediente

$A_i$  : Efecto del pH

$B_j$  : Efecto del nivel de enzima

$(AB)_{ij}$  : Interacción entre pH y enzima

$(IA)_{ki}$  : Interacción entre ingrediente y pH

$(IB)_{kj}$  : Interacción entre ingrediente y enzima

$(IAB)_{ijk}$  : Interacción entre ingrediente, pH y enzima

$\varepsilon_{ijkl}$  : error experimental

Juego de hipótesis estadísticas

Sobre los efectos principales

$$H_0: A_1 (\text{pH bajo}) = A_2 (\text{pH alto})$$

$H_a: \text{Existe al menos una diferencia}$

$$H_0: B_1 ([E] bajo) = B_2 ([E] alto)$$

$H_a: \text{Existe al menos una diferencia}$

Sobre las interacciones

$$H_0: (AB)_{11} = (AB)_{12} = (AB)_{22}$$

$$H_a: (IA)_{11} = (IA)_{...} = (IA)_{82}$$

$$H_a: (IB)_{11} = (IB)_{...} = (IB)_{82}$$

$$H_a: (IAB)_{11} = (IAB)_{...} = (IAB)_{84}$$

$H_a: \text{Existe al menos una diferencia}$

Respecto al testigo (T)

$$H_0: T = D = A = B = C$$

$$H_a: T \neq D \neq A \neq B \neq C$$

$$H_a: T > o < D; A; B; C$$

## COMPOSICION QUIMICA DE INGREDIENTES

En la siguiente tabla (Tabla N.º 17, 18 y 19) se presenta la composición química de los ingredientes utilizados para los experimentos *in vitro e in vivo* expresados como porcentaje sobre la materia seca.

Tabla N.º 14: Composición química de los cereales evaluados. (en base fresca).

| Ingrediente        | MS %   | PB %   | Almidón % | aNDF % | ADF % | ADL % |
|--------------------|--------|--------|-----------|--------|-------|-------|
| <b>Maíz</b>        | 88,86% | 7,44%  | 62,00%    | 7,00%  | 2,70% | 0,35% |
| <b>Trigo</b>       | 88,16% | 11,50% | 56,80%    | 19,30% | 2,90% | 0,97% |
| <b>Cebada</b>      | 90,25% | 10,06% | 50,20%    | 17,20% | 6,10% | 0,96% |
| <b>Cebada Ext.</b> | 90,95% | 12,19% | 43,80%    | 16,40% | 6,60% | 1,14% |

Tabla N.º 15: Composición química de los proteicos evaluados. (en base fresca).

| Ingrediente | MS %   | PB %   | Almidón % | aNDF % | ADF %  | ADL %  |
|-------------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| <b>SBM</b>  | 89,16% | 48,25% | 0,20%     | 8,60%  | 5,80%  | 1,25%  |
| <b>aSOY</b> | 95,00% | 53,31% | 0,20%     | 9,30%  | 5,20%  | 1,32%  |
| <b>RSM</b>  | 92,07% | 30,75% | 1,50%     | 33,10% | 27,50% | 10,25% |
| <b>SFM</b>  | 93,81% | 45,63% | 1,10%     | 12,80% | 10,70% | 1,80%  |

Tabla N.º 16: Composición química de los fibrosos evaluados. (en base fresca).

| Ingrediente        | MS %   | PB %   | Almidón % | aNDF % | ADF %  | ADL % |
|--------------------|--------|--------|-----------|--------|--------|-------|
| <b>WB</b>          | 90,39% | 15,81% | 14,50%    | 40,80% | 12,90% | 4,20% |
| <b>SBP</b>         | 91,11% | 10,69% | 0,00%     | 62,70% | 48,70% | 2,01% |
| <b>Citrus Pulp</b> | 88,35% | 5,31%  | 6,70%     | 17,80% | 14,50% | 3,49% |
| <b>Soy Hulls</b>   | 91,91% | 8,06%  | 0,40%     | 39,20% | 24,40% | 6,90% |

## DIGESTIBILIDAD IN VIVO

Los **coeficientes de digestibilidad in vivo** utilizados como referencia fueron obtenidos en estudios previos realizados en el **Servei de Nutrició i Benestar Animal (SNiBA)** de la **Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**, Bellaterra, España.

Se trabajó con **lechones destetados a los 25 días de edad**, con un peso vivo de **7 kg** promedio, alimentados con **dietas subóptimas** formuladas para caracterizar la **cinética de digestión** de diversos ingredientes. Las dietas experimentales contenían **90 - 95 % de inclusión para cereales, 25 % para fuentes proteicas y 7,5 % para fuentes**

**fibrosas**, distribuidas en dos ensayos independientes (uno para cereales y otro para proteicos y fibrosos).

Las dietas fueron suministradas en forma de harina y molidas finamente para asegurar homogeneidad y evitar selección. La composición analítica completa se detalla en el Anexo N.º 1 – 4, estas formulaciones fueron realizadas por Dr. J.F. Pérez Hernández (SNiBA-UAB) y Dra. M.A. Ton Nu (AB-NEO).

En total se evaluaron **8 fuentes de cereales, 4 fuentes proteicas y 4 fibrosas**. Para los análisis comparativos con digestibilidad in vitro se seleccionaron **4 cereales y 4 proteicos**.

#### Variables analizadas

La digestibilidad se calculó mediante la **diferencia en la concentración del marcador** entre la dieta y la digesta ileal, utilizando **óxido de iterbio** (Ytterbium Oxide) (Terbium(III) ® Yb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich®) al 0,05 % como marcador externo (50 mg/kg).

Los datos individuales por animal fueron filtrados para eliminar valores fuera de rango, reemplazándolos por el promedio del resto.

Las fórmulas utilizadas fueron:

$$ID (\%) = [ 1 - ( Yb_2O_3 \text{ dieta} / Yb_2O_3 \text{ digesta} ) ] \times 100$$

$$ID N (\%) = [ 1 - ( N \text{ dieta} / Yb_2O_3 \text{ dieta} ) / ( N \text{ digesta} / Yb_2O_3 \text{ digesta} ) ] \times 100$$

Las determinaciones analíticas se realizaron por:

**Nitrógeno**: método Kjeldahl.

**Almidón**: método enzimático, MegazYme ® referencia K-TSTA-100A.

**Fracciones de fibra**: método de Van Soest (1994) protocolo ANKOM ®.

Este análisis fue basado en información del proyecto “CHOPIN – Fiber fermentation kinetics – in vitro model 2024” llevado a cabo por investigadores pertenecientes al SNiBA y en dirección del Dr. José Francisco Pérez Hernández en conjunto con la empresa AB-NEO a/s AB Agri Ltd., no ligando este documento directamente en el uso de animales experimentales.

### Análisis Estadístico

El diseño estadístico utilizado en este experimento fue un **diseño completamente al azar (DCA)**, donde en un total de **32 corrales de tres lechones por corral** se suministró cada tratamiento en **4 réplicas**, resultando en un número total de animales de **96 animales y 12 animales por tratamiento**. La asignación de tratamientos se realizó en grupo, siendo la unidad experimental cada corral de tres lechones.

#### *Modelo general del experimento (DCA con submuestreo)*

$$Y_{ij} = \mu + \gamma_i + \delta_{k(ij)} + \varepsilon_{ij}$$

$i = M, T, C, CE, SBM, aSOY, RSM, SFM$   
 $j = r 1, 2, 3, 4$   
 $k = s 1, 2, 3$

$Y_{ijkm}$ : variable de respuesta

$\mu$ : media de la población

$\gamma_i$ : efecto del  $i$ -esimo tratamiento (M, T, C, CE, SBM, aSOY, RSM, SFM)

$\delta_{k(ij)}$ : efecto del submuestreo

$\varepsilon_{ij}$ : es el error experimental

El experimento **fue dividido en dos, cereales y proteicos**. En el primero, dado las condiciones de las dietas formuladas, los resultados pueden ser cuestionables ya que **la ingestión de pienso por parte de los lechones recién destetados fue limitada y por ende la colección de muestras** en las diferentes fracciones del tracto digestivo. Esto condiciono al procesamiento de muestras y de datos, recurriendo inevitablemente a la necesidad de reunir varias muestras en una “pooling de muestras” para su análisis.

## VALORES DE DIGESTIBILIDAD IN VIVO

En las tablas siguientes se presentan los valores de digestibilidad calculados por diferencia para los cereales (Tabla N.º 20), y Tabla N.º 21 para los proteicos aportados por el experimento *in vivo* en lechones los cuales proceden de dietas elaboradas con los mismos alimentos.

*Tabla N.º 17: Coeficientes de digestibilidad ileal y fecal de la materia seca y almidón para los cereales en el experimento in vivo.*

| Ingrediente        | dMS % (ileal) | dAlmidón % (ileal) | dAlmidón % (fecal) |
|--------------------|---------------|--------------------|--------------------|
| <b>Maíz</b>        | 74,0%         | 78,0%              | 98,0%              |
| <b>Trigo</b>       | 63,0%         | 88,0%              | 99,0%              |
| <b>Cebada</b>      | 65,0%         | 95,0%              | 99,0%              |
| <b>Cebada Ext.</b> | 61,0%         | 98,0%              | 99,0%              |

- Valores aportados por J. F. Pérez Hernández – SNiBA (UAB)

*Tabla N.º 18: Coeficientes de digestibilidad ileal y fecal de la materia seca y proteína bruta para los proteicos en el experimento in vivo.*

| Ingrediente | dMS % (ileal) | dMS % (fecal) | dPB % (ileal) |
|-------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>SBM</b>  | 66,7%         | 84,5%         | 59,5%         |
| <b>ASOY</b> | 68,1%         | 81,5%         | 64,1%         |
| <b>RSM</b>  | 65,8%         | 77,2%         | 56,4%         |
| <b>SFM</b>  | 71,8%         | 83,6%         | 71,6%         |

*dPB % (Digestibilidad Aparente (sin corregir por perdidas endógenas)) - Valores aportados por J. F. Pérez Hernández – SNiBA (UAB)*

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **DIGESTIBILIDAD IN VITRO POR EL METODO DE REFERENCIA ADAPTADO (STD)**

En este apartado se presentan los resultados obtenidos mediante el **método de referencia adaptado a la incubación múltiple en incubador Daisy II (STD)**, que sirvió como base para comparar los efectos de diferentes modificaciones metodológicas.

Las figuras siguientes muestran los **coeficientes de digestibilidad ileal in vitro** para dos grupos de ingredientes: **cereales (Figura N.º 22)**, en los que se evaluó la **digestibilidad de la materia seca (MS) y del almidón**, y **proteicos (Figura N.º 23)**, donde se analizó la **MS y la proteína bruta (PB)**.

Estas representaciones gráficas son clave para entender el **comportamiento digestivo basal** de cada ingrediente y permiten comparar los efectos de los tratamientos alternativos que se analizan en las secciones posteriores.

#### Cereales: Maíz, Trigo, Cebada, Cebada Extrusionada

Bajo el protocolo STD, los **cereales evaluados** mostraron una digestibilidad ileal in vitro (IVD) **alta para la materia seca (MS)**, con valores que oscilaron entre **0,69 y 0,86**, y aún **mayores para el almidón**, con coeficientes por encima del **0,87** en todos los casos. Entre los ingredientes, el **trigo** presentó los valores más altos tanto para la MS como para el almidón, mientras que la **cebada** mostró los más bajos, especialmente en la digestibilidad de la MS (Figura N.º 22).

La diferencia entre digestibilidad de la MS y del almidón se mantuvo constante en todos los cereales, reflejando que la fracción amilácea es **altamente digestible en condiciones estándar**, mientras que las variaciones en la MS total están probablemente asociadas a diferencias en las fracciones **fibrosas o proteicas** de los diferentes ingredientes.

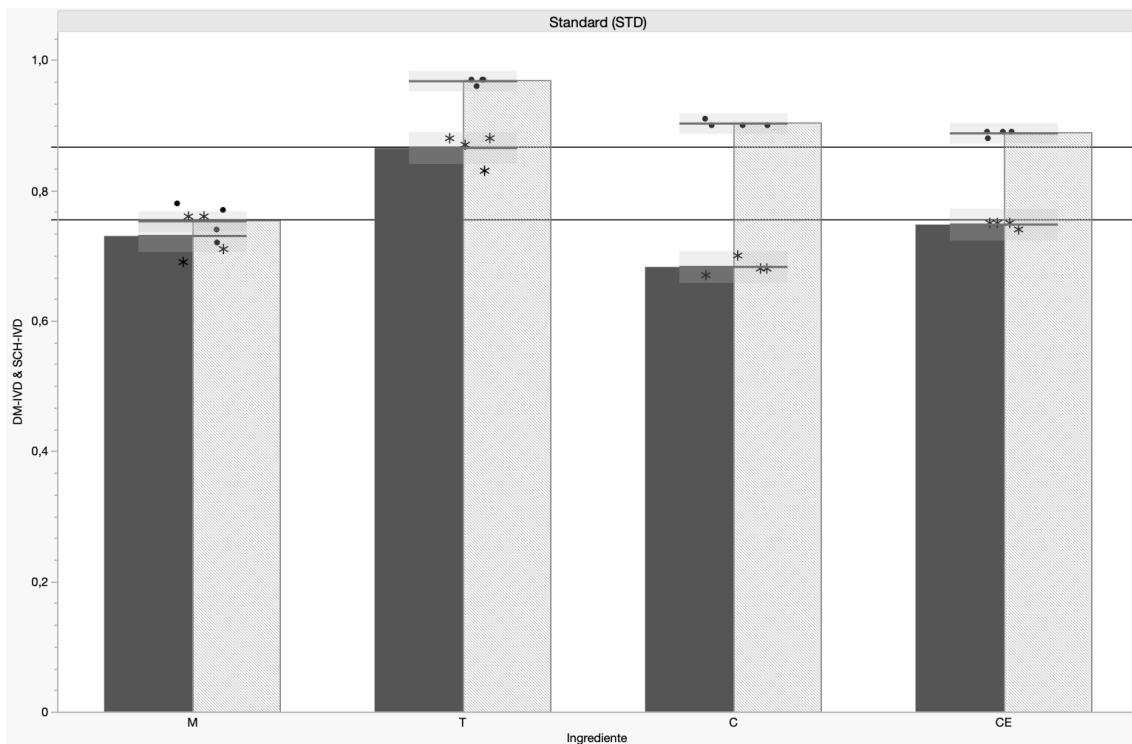


Figura N.º 13: Digestibilidad ileal de la materia seca y del almidón para los cereales (M, T, C y CE) según el método de referencia (STD) adaptado.

Donde: Gris Oscuro: Digestibilidad de la MS (MS-IVD %); Gris Claro: Digestibilidad del Almidón (SCH-IVD %); M: Maíz; T: Trigo; C: Cebada; CE: Cebada Extrusionada.

Se puede destacar que la digestión del almidón en el maíz es inferior al resto, debido a su mayor proporción de almidón vitreo y resistente, el cual es de difícil acceso para la degradación enzimática (Lehninger, 1990; Gutiérrez & Tovar, 2021).

Estos resultados establecen un **perfil base para los cereales**, útil como punto de comparación frente a los tratamientos alternativos que incluyen modificaciones en el pH, concentración enzimática y combinaciones de ambos.

Proteicos: Harina de soja, concentrado de soja, harina de colza y concentrado proteico de girasol.

En el grupo de **ingredientes proteicos**, la **digestibilidad de la materia seca (IVD-MS)** mostró una mayor variabilidad que en los cereales, con valores que oscilaron entre **0,48** y **0,79**. La **harina de soja (SBM)** y ASOY presentaron los coeficientes más altos, mientras que la **harina de colza (RSM)** se ubicó claramente por debajo del resto, con valores cercanos a **0,48**, tanto para la MS como para la PB (Figura N.º 23).

En cuanto a la **digestibilidad de la proteína bruta (IVD-PB)**, los valores fueron **altos en todos los ingredientes**, especialmente en el **concentrado de harina de girasol**

**(SFM)** y **SBM**, superando el **90 %**, lo que indica una alta solubilización proteica bajo condiciones estándar. La excepción nuevamente fue la RSM, con valores inferiores al 80 %, lo que podría atribuirse a la presencia de compuestos anti nutricionales o a una matriz estructural más resistente a la hidrólisis enzimática. Este ingrediente (SFM), presenta particularidades que lo diferencian frente a la harina de girasol normal, ya que ha recibido un proceso industrial extra aparte del descascarillado, es por ello por lo que presenta mayor concentración de PB (47%) y muy bajo nivel de fibra (NDF) (13%), frente a la harina de girasol descascarillada que presenta valores en torno a 32-34 % PB y 32-35% NDF (*Feed Tables-FEDNA*).

Estos resultados reflejan una **alta eficiencia digestiva del método STD** adaptado para proteínas de alta calidad como las de SFM y ASOY, pero también evidencian que el método es sensible a la **variabilidad composicional y estructural** de los ingredientes. Por tanto, esta base de datos permite establecer un punto de comparación claro frente a los efectos de modificaciones posteriores al protocolo estándar.

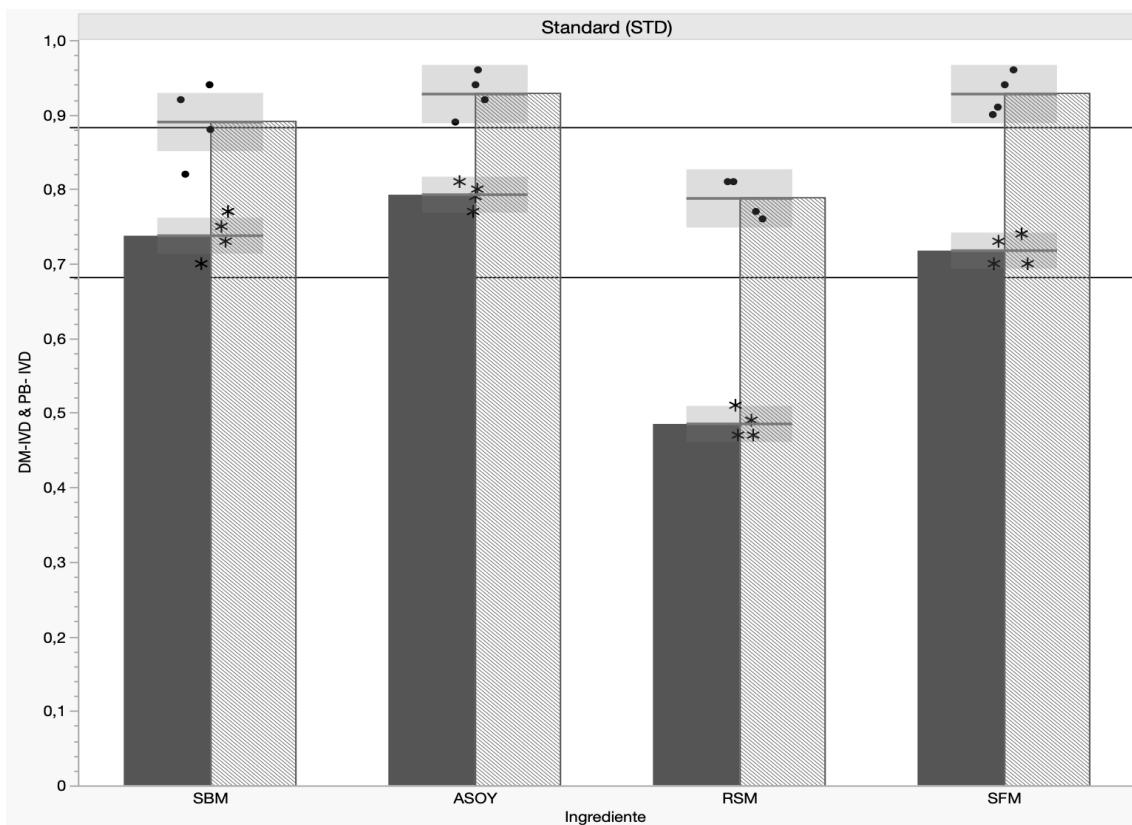


Figura N.º 14: Digestibilidad ileal de la materia seca y de la proteína para los proteicos (SBM, ASOY, RSM, SFM) según el método de referencia (STD) adaptado.

Donde: Gris Oscuro: Digestibilidad de la MS (MS-IVD %); Gris Claro: Digestibilidad de la PB (PB-IVD %); SBM: Harina de Soja; ASOY: Alpha Soy; RSM: Harina de Colza; SFM: Conc. Prot. de Girasol.

## EFFECTOS DE LAS MODIFICACIONES PROPUESTAS (IN VITRO)

### Cereales

La siguiente tabla (Tabla N.º 32) presenta los **promedios generales de digestibilidad ileal in vitro** de la **materia seca (MS)** y del **almidón** para los ingredientes cereales, agrupados según el tratamiento aplicado. Estos valores representan el promedio de todos los ingredientes del grupo bajo cada condición metodológica (STD, A, B, C).

*Tabla N.º 19: Promedio de los efectos de cada tratamiento sobre la digestibilidad de la MS y almidón.*

| Variable    | STD                        | A [Baja E]                 | B [alto pH]                | C [alto pH x baja E]              | EE     | Sig.  |      |       |
|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|--------|-------|------|-------|
|             |                            |                            |                            |                                   |        | Trat. | Ing. | M x I |
| IVD - MS %  | 0,763 (a)<br>(0,752-0,774) | 0,756 (a)<br>(0,746-0,767) | 0,766 (a)<br>(0,755-0,777) | <b>0,736 (b)</b><br>(0,725-0,747) | 0,0054 | **    | **   | 0,417 |
| IVD - Alm % | 0,878 (a)<br>(0,871-0,885) | 0,879 (a)<br>(0,872-0,886) | 0,884 (a)<br>(0,877-0,891) | <b>0,828 (b)</b><br>(0,821-0,835) | 0,0035 | **    | **   | **    |

\*comparativa horizontal (TUKEY alfa 0,05)

En términos generales, la **digestibilidad del almidón** mostró valores **elevados y estables** en los tratamientos A y B, mientras que el tratamiento **C (bajo enzima + alto pH)** presentó una **reducción significativa**, en especial en almidón. Para la **MS**, los cambios fueron menos marcados, aunque también se observó una disminución en el tratamiento combinado. Esto sugiere que los efectos negativos sobre la digestibilidad se acentúan cuando se combinan alteraciones en pH y concentración enzimática.

La siguiente tabla (Tabla N.º 33) muestra el **análisis estadístico multifactorial**, en el que se evaluaron los **efectos individuales** de los factores pH, enzima e ingrediente, así como sus **interacciones**, sobre la digestibilidad de la MS y del almidón en cereales.

*Tabla N.º 20: Significancia de los efectos individuales y su interacción sobre las variables.*

| Variable    | Ingrediente | pH                | [E]               | pH x [E] | Ingr. x pH | Ingr. x [E] | Ingr. x pH x [E] |
|-------------|-------------|-------------------|-------------------|----------|------------|-------------|------------------|
| IVD - MS %  | <0,0001     | 0,114             | <b>0,001</b>      | 0,032    | 0,728      | 0,226       | 0,318            |
| IVD - Alm % | <0,0001     | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <0,0001  | 0,002      | 0,324       | <0,0001          |

El análisis revela que tanto la **concentración enzimática** como el **tipo de ingrediente** influyen significativamente en la digestibilidad ( $p < 0,001$ ), tanto para MS como para almidón. Las **interacciones entre pH y enzima**, así como **ingrediente × enzima**, también resultaron significativas, lo que indica que la **respuesta a las condiciones metodológicas varía según el ingrediente**.

A continuación, se presentan las **comparaciones de medias** para cada cereal bajo los distintos tratamientos. La Tabla N.<sup>o</sup> 34 muestra los valores correspondientes a la **digestibilidad de la MS**, y la Tabla N.<sup>o</sup> 35, los de **almidón**.

*Tabla N.<sup>o</sup> 21: Comparativa de medias entre todos los tratamientos e ingredientes (M, T, C, CE) para la variable coeficiente de digestibilidad de la materia seca (MS).*

| pH<br>[Enzima] | pH : 2.0    |             | pH : 4.0    |                    | EE    |
|----------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|-------|
|                | Alto        | Bajo        | Alto        | Bajo               |       |
| IVD-MS % M     | 0,741 (bc)  | 0,731 (bcd) | 0,722 (bcd) | <b>0,721 (bcd)</b> |       |
| IVD-MS % T     | 0,864 (a)   | 0,866 (a)   | 0,869 (a)   | <b>0,843 (a)</b>   |       |
| IVD-MS % C     | 0,693 (cde) | 0,681 (de)  | 0,719 (bcd) | <b>0,658 (e)</b>   | 0,015 |
| IVD-MS % CE    | 0,753 (b)   | 0,747 (bc)  | 0,754 (b)   | <b>0,720 (bcd)</b> |       |

\*comparativa de todas las medias (TUKEY alfa 0,05)

*Tabla N.<sup>o</sup> 22: Comparativa de medias entre todos los tratamientos e ingredientes para la variable coeficiente de digestibilidad del almidón.*

| pH<br>[Enzima] | pH : 2.0   |             | pH : 4.0   |                   | EE    |
|----------------|------------|-------------|------------|-------------------|-------|
|                | Alto       | Bajo        | Alto       | Bajo              |       |
| IVD-Alm % M    | 0,787 (g)  | 0,751 (h)   | 0,771 (gh) | <b>0,736 (h)</b>  |       |
| IVD-Alm % T    | 0,966 (ab) | 0,971 (a)   | 0,971 (a)  | <b>0,932 (bc)</b> |       |
| IVD-Alm % C    | 0,846 (f)  | 0,904 (cde) | 0,886 (de) | <b>0,771 (gh)</b> | 0,010 |
| IVD-Alm % CE   | 0,913 (cd) | 0,889 (de)  | 0,909 (cd) | <b>0,873 (ef)</b> |       |

\*comparativa de todas las medias (TUKEY alfa 0,05)

Se observa que la **cebada** y el **maíz** fueron los ingredientes más sensibles a los tratamientos modificados, especialmente en la digestibilidad del almidón. En cambio, el **trigo y cebada extrusionada, que inicialmente presentaron mayores digestibilidades del almidón**, mantuvieron valores más estables frente a las variaciones de pH y enzima.

Estos resultados sugieren que **la digestión está muy ligada a características específicas de cada ingrediente**, y que el efecto del tratamiento debe interpretarse en función de la **matriz estructural**.

La figura siguiente (Figura N.º 24) complementa el análisis anterior mostrando los **resultados expresados de forma relativa al tratamiento estándar (STD)**. Se representa el **porcentaje de digestibilidad** respecto al valor de referencia, lo que permite visualizar más claramente las **pérdidas o mejoras relativas** causadas por los tratamientos A, B y C.

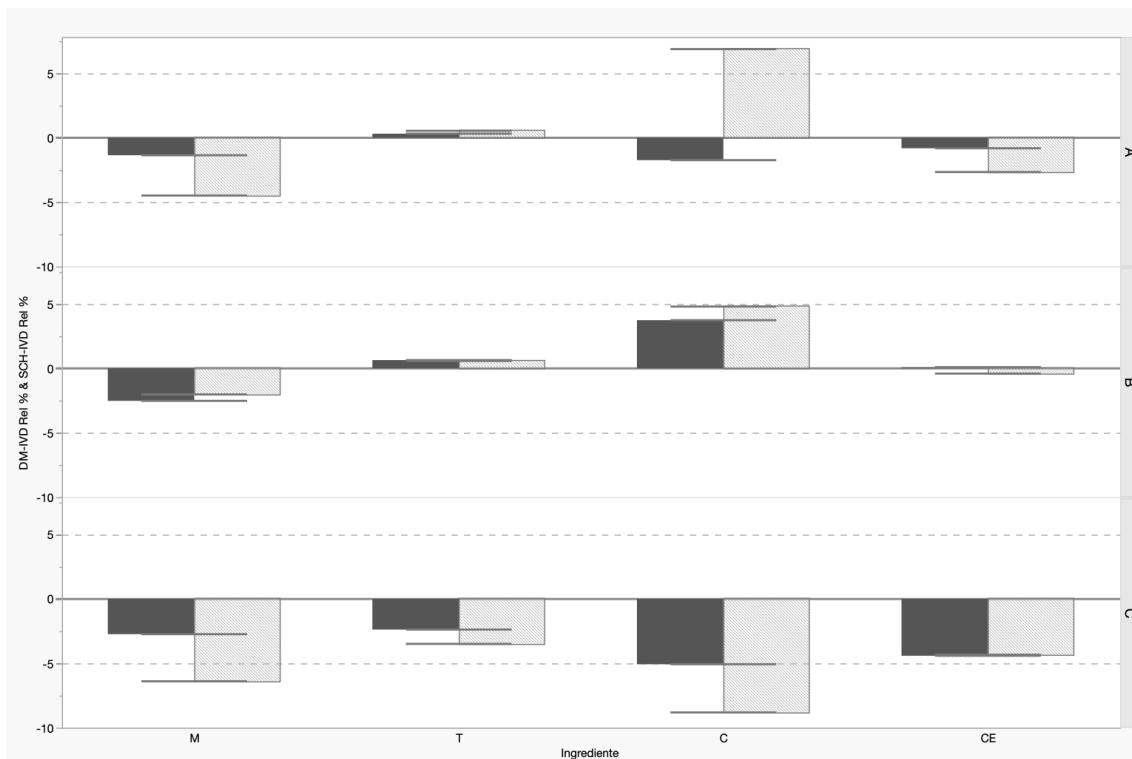


Figura N.º 15: Comparativa de digestibilidad de la MS y almidón por ingrediente de los tres tratamientos alternativos relativo porcentual al STD.

Donde: A:[baja enzima, pH2.0]; B[alta enzima, pH4.0]; C:[baja enzima, pH4.0]; Gris Oscuro: Digestibilidad de la MS relativo al STD (MS-IVD %); Gris Claro: Digestibilidad del Almidón relativo al STD (SCH-IVD %); Maíz; T: Trigo; C: Cebada; CE: Cebada Extrusiónada.

Se observa que el tratamiento C generó las **mayores reducciones relativas** en la digestibilidad, particularmente del almidón. La visualización porcentual resalta que, aunque los valores absolutos pueden parecer cercanos, hay **impactos proporcionales importantes** en ciertos ingredientes. Este enfoque gráfico facilita la interpretación comparativa entre tratamientos y visualización en función de los objetivos buscados para la categoría en cuestión.

## Proteicos

La siguiente tabla (Tabla N.<sup>o</sup> 36) presenta los **valores promedio generales** de digestibilidad ileal in vitro de la **materia seca (MS)** y de la **proteína bruta (PB)** para los ingredientes proteicos, agrupados según el tratamiento aplicado. Estos valores corresponden al promedio de todos los ingredientes bajo cada condición metodológica.

*Tabla N.<sup>o</sup> 23: Promedio de los efectos de cada tratamiento sobre la digestibilidad de la MS Y PB*

| Variable   | STD                        |                             |                                   |                                   |       | Sig.  |      |     |
|------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|------|-----|
|            |                            | A [Baja E]                  | B [alto pH]                       | C [alto pH x baja E]              | EE    | Trat. | Ing. | MxI |
| IVD - MS % | 0,683 (a)<br>(0,672-0,694) | 0,671 (ab)<br>(0,660-0,681) | 0,660 (bc)<br>(0,649-0,671)       | <b>0,648 (c)</b><br>(0,637-0,658) | 0,005 | **    | **   | **  |
| IVD - PB % | 0,883 (a)<br>(0,866-0,90)  | 0,803 (b)<br>(0,754-0,788)  | <b>0,771 (c)</b><br>(0,754-0,788) | <b>0,763 (c)</b><br>(0,746-0,779) | 0,008 | **    | **   | **  |

La digestibilidad de la **materia seca (MS)** mostró una **disminución progresiva** desde el tratamiento estándar hacia el tratamiento combinado (C), siendo **más marcada** en este último. Para la **proteína bruta (PB)**, el tratamiento A no generó reducciones importantes, pero los tratamientos B y C produjeron una caída significativa en varios ingredientes. En especial el C, esto sugiere que la digestibilidad proteica es **más sensible a la combinación de alteraciones** que a los factores individuales por separado.

A continuación, se presenta el **análisis estadístico multifactorial**, que evalúa el efecto individual de cada factor (pH, enzima, ingrediente) y sus **interacciones** sobre la digestibilidad ileal de la MS y de la PB en los ingredientes proteicos (Tabla N.<sup>o</sup> 37).

*Tabla N.<sup>o</sup> 24: Significancia de los efectos individuales y su interacción sobre las variables.*

| Variable   | Ingrediente | pH                | [E]               | pH x [E] | Ingr. x pH | Ingr. x [E] | Ingr. x pH x [E] |
|------------|-------------|-------------------|-------------------|----------|------------|-------------|------------------|
| IVD - MS % | <0,0001     | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,025</b>      | ns       | <0,0001    | 0,006       | 0,001            |
| IVD - PB % | <0,0001     | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <0,0001  | <0,0001    | 0,000       | 0,005            |

El análisis estadístico confirma que tanto el tipo de ingrediente, el pH gástrico como la concentración enzimática influyen significativamente en la digestibilidad de MS y PB ( $p < 0,001$ ). Asimismo, se detectaron interacciones significativas entre ingrediente  $\times$  enzima y enzima  $\times$  pH, lo cual indica que los efectos de las modificaciones metodológicas no son uniformes y que la respuesta digestiva depende del ingrediente específico y la combinación de factores.

Las siguientes tablas muestran la comparación de medias para cada tratamiento aplicado en cada ingrediente proteico. La Tabla N.º 38 corresponde a la digestibilidad de la **materia seca (MS)** y la Tabla N.º 39, a la digestibilidad de la **proteína bruta (PB)**.

*Tabla N.º 25: Comparativa de medias entre todos los tratamientos e ingredientes (SBM, ASOY, RSM, SFM) para la variable coeficiente de digestibilidad de la materia seca (MS).*

| pH<br>[Enzima] | pH : 2.0   |            | pH : 4.0   |                   | EE    |
|----------------|------------|------------|------------|-------------------|-------|
|                | Alto       | Bajo       | Alto       | Bajo              |       |
| IVD-MS % SBM   | 0,738 (c)  | 0,720 (cd) | 0,693 (de) | <b>0,633 (f)</b>  |       |
| IVD-MS % ASOY  | 0,793 (a)  | 0,770 (ab) | 0,670 (e)  | <b>0,728 (c)</b>  |       |
| IVD-MS % RSM   | 0,485 (g)  | 0,483 (g)  | 0,508 (g)  | <b>0,490 (g)</b>  | 0,015 |
| IVD-MS % SFM   | 0,718 (cd) | 0,710 (cd) | 0,770 (ab) | <b>0,740 (bc)</b> |       |

\*comparativa de todas las medias (TUKEY alfa 0,05)

*Tabla N.º 26: Comparativa de medias entre todos los tratamientos e ingredientes para la variable coeficiente de digestibilidad de la proteína bruta (PB).*

| pH<br>[Enzima] | pH : 2.0   |            | pH : 4.0   |                   | EE    |
|----------------|------------|------------|------------|-------------------|-------|
|                | Alto       | Bajo       | Alto       | Bajo              |       |
| IVD-PB % SBM   | 0,890 (ab) | 0,810 (cd) | 0,730 (e)  | <b>0,628 (g)</b>  |       |
| IVD-PB % ASOY  | 0,928 (a)  | 0,868 (b)  | 0,690 (ef) | <b>0,785 (fd)</b> |       |
| IVD-PB % RSM   | 0,788 (d)  | 0,680 (f)  | 0,735 (e)  | <b>0,723 (ef)</b> | 0,024 |
| IVD-PB % SFM   | 0,928 (a)  | 0,918 (a)  | 0,930 (a)  | <b>0,855 (bc)</b> |       |

\*comparativa de todas las medias (TUKEY alfa 0,05)

Entre los ingredientes proteicos, la **harina de soja (SBM)** y el **concentrado proteico de soja (ASOY)** fueron los más afectados por los tratamientos alternativos, con reducciones marcadas tanto en MS como en PB, especialmente bajo el **tratamiento C**. En cambio, la **harina de colza (RSM)** y el concentrado de harina de **girasol (SFM)** mostraron una mayor estabilidad frente a las modificaciones. Estos resultados indican que los ingredientes con **estructura más resistente, más fibra, contenido de factores anti**

**nutricionales o matrices proteicas diferentes**, se comportan diferente frente a condiciones subóptimas enzimáticas o de pH.

El **efecto del pH** en este caso, a diferencia de los cereales, si es **muy significativo** y presenta un **comportamiento similar cuando se lo compara independiente al nivel de enzima**. Si bien, no es igual la magnitud para cada condición y existe interacción con el ingrediente, los cuatro proteicos **disminuyen su digestibilidad al incrementar el pH** (pH = 4.0) en la primera fase. Estas diferencias pueden ser producto de **dos factores**, por un lado, la **efectividad y activación de la pepsina** y por otro lado la **menor desnaturalización de las proteínas** respecto a un pH menor (pH = 2.0), eventualmente la combinación de ambas consecuencias (McDonald et al., 2022).

La siguiente figura (Figura N.º 25) presenta los resultados de digestibilidad expresados de forma **relativa (%) respecto al tratamiento estándar (STD)**. Esta representación permite comparar **las variaciones proporcionales** en la respuesta digestiva de cada ingrediente a los diferentes tratamientos.

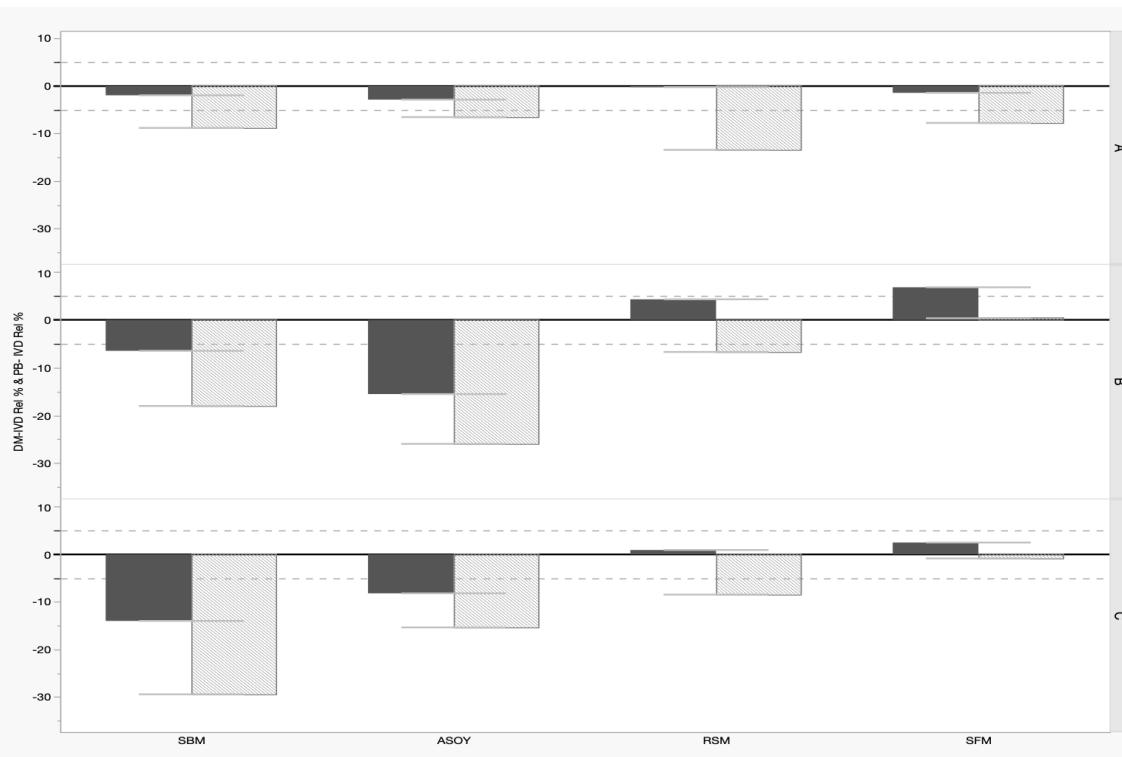


Figura N.º 16: Comparativa de digestibilidad de la MS y PB por ingrediente de los tres tratamientos alternativos relativo porcentual al STD.

Donde: A:[baja enzima, pH2.0]; B[alta enzima, pH4.0]; C:[baja enzima, pH4.0] Gris Oscuro: Digestibilidad de la MS relativo al STD (MS-IVD %); Gris Claro: Digestibilidad de la PB relativo al STD (PB-IVD %); SBM: Harina de Soja; ASOY: Alpha Soy; RSM: Harina de Colza; SFM: Conc. Prot. de Girasol.

La visualización relativa destaca que el tratamiento C (**bajo enzima + alto pH**) y el B (**alto pH**) tuvieron el **mayor impacto negativo** en casi todos los ingredientes, especialmente en los compuestos por soja. Por el contrario, el tratamiento A (bajo enzima) tuvo efectos moderados o nulos en algunos casos. Esta figura facilita la comparación transversal entre ingredientes y tratamientos, y evidencia que las **variaciones metodológicas no afectan a todos los ingredientes por igual**.

Tanto para SBM como ASOY, el comportamiento es marcado a una gran reducción de la digestibilidad de la PB. Posiblemente a una relación en contenido total de PB y la **velocidad de degradación intrínseca a su matriz estructural**.

### Conclusión General

En conjunto, los resultados indican que el protocolo STD **presenta cierta estabilidad frente a modificaciones individuales**, ya sea en la concentración enzimática o en el pH. Sin embargo, cuando ambas condiciones se combinan (tratamiento C), se observa una **reducción significativa en los coeficientes de digestibilidad**, particularmente en el almidón de los cereales y en la PB de los ingredientes proteicos. No obstante, los resultados en los **proteicos están muy influidos por el pH**, aspecto que se evidencia por la **similitud registrada en la digestibilidad** de la PB entre C y B.

Esta respuesta no es negativa, sino por el contrario, resulta **deseable** en el contexto del presente estudio, ya que el objetivo es evaluar variaciones del protocolo STD que **permitan una mejor aproximación al modelo digestivo del lechón al destete**. Donde este presenta una **capacidad limitada para acidificar el contenido gástrico** y una **secreción enzimática reducida**. En este sentido, la disminución de la digestibilidad observada bajo condiciones de **bajo enzima + alto pH** podría reflejar de forma más realista la respuesta digestiva de animales jóvenes, en comparación con el protocolo STD que ha sido validado principalmente para animales en crecimiento.

Además, se comprobó que la respuesta a las variaciones metodológicas es **dependiente del ingrediente**, destacándose una mayor sensibilidad en ingredientes como **soja, maíz y colza**, mientras que otros como **girasol o trigo** mostraron una mayor estabilidad. Esto refuerza la importancia de considerar las **características estructurales y composicionales de cada ingrediente** al momento de seleccionar o ajustar condiciones in vitro.

En conclusión, el presente experimento aporta evidencia para proponer una adaptación metodológica que **mejore la representatividad fisiológica del sistema digestivo del lechón al destete**, especialmente en la estimación de la digestibilidad ileal de MS, PB y almidón.

## **COMPARATIVA DE LAS ALTERNATIVAS *IN VITRO* RESPECTO A LOS RESULTADOS *IN VIVO*.**

### Cereales

Dado que el **almidón representa la principal fuente energética** en dietas basadas en cereales, su **digestibilidad ileal adquiere un papel central** en la evaluación comparativa de ingredientes (Aguilera et al., 2005). Esta digestibilidad está condicionada no solo por la **naturaleza del almidón** (tipo de gránulo, grado de cristalización, presencia de matriz proteica o fibra), sino también por las **condiciones del entorno digestivo**, principalmente el **pH** y la **actividad enzimática**, factores que pueden ser modulados en los modelos *in vitro* (Fuller, 1991). Si bien los **datos *in vivo* fueron considerados como testigo**, estos presentaron **algunas inconsistencias** que **limitan su confiabilidad absoluta**, particularmente en el **orden esperado de digestibilidad entre ingredientes**.

En el caso del **maíz**, tanto la digestibilidad de la materia seca como la del almidón *in vivo* fueron relativamente bajas (**74,0 %** y **78,0 %**, respectivamente), lo cual concuerda con lo reportado para este cereal, cuyo almidón vitreo es reconocido por su menor accesibilidad enzimática (Aguilera et al., 2005). Los valores obtenidos mediante los cuatro protocolos *in vitro* se situaron entre **0,731 y 0,741 para la materia seca, y entre 0,736 y 0,787 para el almidón**. En ambos casos, el tratamiento con **pH 2.0 y alta concentración enzimática** fue el que arrojó los **valores más cercanos** a los obtenidos *in vivo*, lo que sugiere que condiciones más ácidas y con mayor presencia de enzimas simulan con mayor precisión el entorno digestivo para este cereal.

En el **trigo**, se observaron **discrepancias significativas entre los valores *in vivo* e *in vitro***, particularmente en la **digestibilidad de la materia seca**, que fue reportada en solo **63,0 % *in vivo***, frente a valores *in vitro* que oscilaron entre **0,843 y 0,869**. Para el almidón, el valor *in vivo* **fue de 88,0 %**, mientras que los valores *in vitro* fueron notablemente superiores (**0,932–0,971**). A pesar de estas diferencias en magnitud, todos

los protocolos *in vitro* ubicaron al trigo como el cereal con **mayor digestibilidad de almidón**, lo cual es coherente con la estructura simple del almidón y reportado por Pérez-Vendrell & Torrallardona, (2010). El protocolo C con **pH 4.0 y enzima baja** fue el que mostró mayor proximidad al valor *in vivo*, especialmente para el almidón. Esta aparente subestimación del trigo en el modelo *in vivo* refuerza la necesidad de **interpretar con cautela estos resultados**, y resalta la estabilidad del modelo *in vitro* para discriminar adecuadamente entre ingredientes.

En la **cebada sin extruir**, los valores *in vivo* fueron de **65,0 %** para la materia seca y **95,0 %** para el almidón. Si bien el valor de almidón *in vivo* fue superior al del trigo, este resultado **contradice lo esperado** desde un punto de vista funcional, ya que la cebada contiene **mayor proporción de polisacáridos no amiláceos (NSP)** particularmente  $\beta$ -glucanos que pueden limitar el acceso enzimático al almidón (Aguilera et al., 2005)(Medel De La Torre, 2000). Los valores *in vitro* para la materia seca se situaron entre **0,658 y 0,719**, siendo el protocolo B con **pH 4.0 y enzima alta** el que presentó mayor proximidad al valor *in vivo*. Para el almidón, los valores *in vitro* oscilaron entre **0,771 y 0,904**, con el valor más alto obtenido bajo **pH 2.0 y enzima baja**, lo que sugiere una **alta sensibilidad del almidón de cebada a condiciones digestivas simuladas**. En general, los ensayos *in vitro* ubicaron correctamente a la cebada por debajo del trigo, tanto en almidón como en MS, reflejando una mayor coherencia con la digestibilidad esperada.

La **cebada extrusionada** mostró una digestibilidad de almidón *in vivo* de **98,0 %**, y de materia seca de solo **61,0 %**. Este contraste no solo es elevado, sino también **fisiológicamente cuestionable**, ya que la **extrusión debería mejorar simultáneamente la digestibilidad del almidón y de la fracción no estructural de la materia seca** como mencionan (Gil et al., 2013; Vicente et al., 2009). En los ensayos *in vitro*, los valores de digestibilidad fueron **más consistentes** y nutricionalmente plausibles: entre **0,720 y 0,754** para la materia seca, y entre **0,873 y 0,913** para el almidón. Nuevamente, el protocolo con **pH 2.0 y enzima alta** se acercó más al valor *in vivo* para ambas fracciones. Estos resultados indican que el modelo *in vitro* **fue capaz de reflejar adecuadamente el efecto del procesamiento térmico**, mientras que los valores *in vivo* podrían haber sido afectados por errores de muestreo o variabilidad biológica.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante **los cuatro protocolos *in vitro*** fueron consistentes entre sí y reflejaron un patrón lógico de digestibilidad del almidón entre los ingredientes evaluados: **trigo > cebada extruida ≈ cebada > maíz**. Este patrón se mantuvo independientemente del pH o del nivel de enzima, aunque los valores absolutos fueron ligeramente superiores bajo pH ácido (2.0) y alta concentración enzimática, lo que indica que estos factores condicionan la velocidad y el grado de hidrólisis del almidón. En cambio, los resultados *in vivo* no siguieron un orden nutricional esperado, lo que limita su valor como testigo en términos absolutos. En este contexto, el modelo *in vitro* se presenta como una herramienta útil para realizar comparaciones relativas entre ingredientes, especialmente en lo que respecta a la fracción amilácea.

Las discrepancias y falta de confiabilidad con los resultados *in vivo* radican en que los animales fueron alimentados con **dietas subóptimas de >90% de inclusión de cereal**. A su vez la **estructura física de la dieta en harina** podría haber generado diferencia en la **selección de partículas** entre fracción fibrosa y almidón harinoso. En este experimento, los animales presentaron **dificultades para la ingestión** y por consecuencia para la **colección de muestras** en el tracto digestivo. Aspecto que **condiciona** la afirmación positiva de estos, ya que para el análisis del marcador utilizado se debió recurrir al **submuestreo de diferentes animales**, perdiendo precisión analítica y estadística.

### Proteicos

La digestibilidad ileal de la materia seca (dMS %) y, especialmente, de la proteína bruta (dPB %) constituye un **parámetro clave** en la evaluación de ingredientes proteicos para dietas de lechones al destete. Factores como la **menor secreción enzimática**, la **capacidad reducida para acidificar** el contenido gástrico y la **mayor susceptibilidad a compuestos anti nutricionales** son condicionantes importantes.

Es importante destacar que los coeficientes de digestibilidad de la PB determinados *in vivo* (Tabla N.º 21 Materiales y Métodos), corresponden a **valores ileales aparentes**, es decir, no han sido corregidos por las **pérdidas endógenas de nitrógeno** (enzimas digestivas, células epiteliales, mucina, etc.). Por lo tanto, estos valores **subestiman la digestibilidad estandarizada** y podrían ser significativamente más elevados si se estimaran como digestibilidad ileal verdadera.

Los resultados mostraron un patrón esperable: el concentrado de SFM **presentó la mayor digestibilidad** de MS y PB, seguido por ASOY y SBM, mientras que RSM **exhibió los valores más bajos**. Esta jerarquía fue reproducida correctamente por los tratamientos in vitro, en especial por el **tratamiento C (baja enzima, pH 4.0)**, que generó coeficientes de digestibilidad **más cercanos a los observados in vivo**.

En el caso de SBM, el valor in vivo de dPB fue de **59,5 %**, mientras que el tratamiento C arrojó un coeficiente in vitro de **62,8 %**, muy próximo al valor real. De manera similar, para la dMS, el valor in vivo fue de **66,7 %**, y el valor in vitro bajo C fue de **63,3 %**. En tratamientos como el estándar (STD) o el A (pH 2.0, baja enzima), la digestibilidad fue **notoriamente superior (hasta 89 % en PB)**, lo que evidencia una **sobreestimación importante** respecto a la categoría objetivo.

Para el concentrado de soja (ASOY), el patrón fue similar: el tratamiento C generó un coeficiente de digestibilidad ileal in vitro de **72,8 % (MS)** y **78,5 % (PB)**, frente a los valores in vivo de 68,1 % y 64,1 %, respectivamente. Si bien aún se observa cierta sobreestimación, esta **se reduce notablemente** en comparación con los tratamientos más favorables, reflejando mejor las condiciones digestivas del lechón al destete. Aunque en este caso el **tratamiento B podría ser más preciso**, su valor puede ser **questionable** por basarse en un número reducido de muestras.

En cuanto a la harina de colza (RSM), ingrediente caracterizado por su **alta proporción de fibra** y la presencia de **compuestos anti nutricionales**, los valores in vitro fueron también bajos en todos los tratamientos. Nuevamente, el **tratamiento C fue el que más se aproximó a los datos** in vivo: **49,0 % (MS)** y **72,3 % (PB)**, comparados con 65,8 % y 56,4 %, respectivamente. También el tratamiento B mostró valores similares, aunque **no se observaron diferencias significativas** entre B y C para este ingrediente. La mayor discrepancia en PB podría deberse a **variaciones en las pérdidas endógenas**, asociadas posiblemente a menor consumo en los animales alimentados con RSM.

Por su parte, el concentrado de harina de girasol (SFM) fue **el ingrediente más digestible en ambos casos**. Los valores in vivo fueron de 71,8 % (MS) y 71,6 % (PB), mientras que los valores in vitro bajo tratamiento C fueron de **74,0 % y 85,5 %**, respectivamente. Si bien este último valor podría parecer elevado, se justifica por la **alta solubilidad** y el **bajo contenido de fibra y factores anti nutricionales** del concentrado

proteico de girasol utilizado, que mantiene una buena digestibilidad incluso en condiciones de pH subóptimo y actividad enzimática limitada.

En conjunto, los datos reflejan que los **tratamientos C y B ofrecen una simulación más cercana** a las condiciones digestivas reales del lechón recién destetado. Particularmente el protocolo **C**, que combina un **pH menos ácido (4.0)** con **baja concentración enzimática**, aparenta **reproducir mejor las restricciones fisiológicas** del animal joven y permite **estimar con mayor aproximación** el comportamiento de los ingredientes proteicos en esa etapa.

## **COMPARATIVA CON LOS RESULTADO EN CERDOS EN CRECIMIENTO**

### Cereales

Los resultados obtenidos en el presente estudio mediante digestibilidad **in vitro ileal**, bajo diferentes combinaciones de pH y concentración enzimática, fueron comparados con datos disponibles en la literatura para **cerdos en crecimiento**. Esta comparación permite poner en contexto los valores obtenidos para distintos ingredientes, considerando tanto su naturaleza química como el perfil fisiológico del animal modelo.

Es importante destacar que la mayoría de los estudios disponibles en la bibliografía reportan **valores de digestibilidad total de la MO**, que incluyen el efecto de la fermentación microbiana en el intestino grueso. En promedio, la digestibilidad total de la MO es **entre un 15 y un 19 % mayor** (valores de comparaciones previas) que la digestibilidad ileal de la MS, debido a la degradación posterior de nutrientes que no fueron absorbidos en el intestino delgado (Boisen & Fernández, 1997; Fuller, 1991). Por lo tanto, los valores totales deben considerarse como un límite superior fisiológico, y no compararse directamente con los valores ileales *in vitro* obtenidos en este trabajo.

Cuando se evalúan las diferentes condiciones de digestión, se **hipotetiza que la más restrictiva** —caracterizada por un pH más alto y menor carga enzimática— **puede ser la que mejor refleje el comportamiento digestivo en lechones al destete**, etapa en la que la capacidad de secreción enzimática y de acidificación gástrica aún no está completamente desarrollada.

En las siguientes tablas (Tabla N.º 40 y 41) se resume la **comparativa** entre los resultados **in vivo en lechones**, los **in vitro STD y ALT C**, con los publicados por Boisen y Fernández 1997 y los **valores de tablas** disponibles para cerdos en crecimiento (*Feed Tables (INRAE-CIRAD-AFZ, 2020); Tablas Brasileñas 2024 (Rostagno et al., 2024)*). En el caso de la **digestibilidad del almidón**, **no existen valores de tabla** para esta; por lo que **se propone una analogía** con la degradabilidad ruminal del almidón en rumiantes, aspecto que se discute y argumenta en la discusión general.

*Tabla N.º 27: Comparativa de los resultados respecto a cerdos en crecimiento para la MS de cereales.*

| MS-MO<br>Ingrediente | In Vivo<br>dMS % (ileal) | In Vitro (MS) (ileal) |       | Cerdos en Crecimiento (MO) (total) |           |               |
|----------------------|--------------------------|-----------------------|-------|------------------------------------|-----------|---------------|
|                      |                          | STD                   | ALT-C | * STD                              | * In Vivo | ° FT - ‡ TB   |
| Maíz                 | 0,740                    | 0,741                 | 0,721 | 0,903                              | 0,880     | 0,894 - 0,859 |
| Trigo                | 0,630                    | 0,864                 | 0,843 | 0,910                              | 0,859     | 0,894 - 0,859 |
| Cebada               | 0,650                    | 0,693                 | 0,658 | 0,840                              | 0,791     | 0,833 - 0,815 |
| Cebada Ext.          | 0,610                    | 0,753                 | 0,720 | s/d                                | s/d       | s/d           |

\* Boisen & Fernández 1997 ° Feed Tables ‡ Tablas Brasileñas

*Tabla N.º 28: Comparativa de los resultados de la digestibilidad del almidón.*

| Almidón<br>Ingrediente | In Vivo<br>dAlm % (ileal) | In Vitro (ileal) |       | Deg. Ruminal<br>° FT |
|------------------------|---------------------------|------------------|-------|----------------------|
|                        |                           | STD              | ALT-C |                      |
| Maiz                   | 0,780                     | 0,787            | 0,736 | 0,610                |
| Trigo                  | 0,880                     | 0,966            | 0,932 | 0,900                |
| Cebada                 | 0,950                     | 0,846            | 0,771 | 0,860                |
| Cebada Ext.            | 0,980                     | 0,913            | 0,873 | s/d                  |

° Feed Tables (Degradabilidad Ruminal INRA 2018) (Rumiantes)

No se encontraron datos específicos de digestibilidad ileal *in vivo* en cerdos en crecimiento para la **cebada extrusionada en las publicaciones del método de referencia**. Sin embargo, los valores obtenidos en este estudio sugieren una mejora funcional atribuible al procesamiento térmico, en línea con lo reportado en otros ingredientes extruidos Aumaitre et al., 1978 citado por (Medel, 2000). La extrusión incrementa la gelatinización del almidón y reduce la resistencia física de la matriz del grano, facilitando su hidrólisis enzimática en el intestino delgado. En este sentido, Chu et al. (1998) reportaron que la extrusión de la cebada incrementó la digestibilidad aparente ileal (DAI) de la proteína bruta en un 10%, aunque no se observaron cambios en la

digestibilidad de la materia seca, similar a lo reportado por Anguita et al. (2006). No obstante, sin más datos *in vivo* disponibles, la magnitud de esta mejora no puede confirmarse empíricamente.

Como complemento a la comparación entre cereales, se considera oportuno mencionar al **salvado de trigo**, que representa la **fracción fibrosa del grano de trigo**. Su interpretación permite observar cómo el aumento en el contenido de fibra y la reducción del almidón afectan la digestibilidad. Boisen & Fernández (1997) reportaron una digestibilidad total de **62,8 %**, con **65,5 %** *in vitro* (crisoles); en 2007, informaron **51,0 %** *in vivo* ileal y **63,0 %** *in vitro*. Son et al. (2024) observaron valores similares: **66,4 %** *in vivo* total, **62,3 %** con crisoles, y **63,4 %** con bolsas F-57. Las *Feed Tables* y las *Tablas Brasileñas* 2024 sitúan su digestibilidad total en torno a **60–62 %**. Finalmente, Meunier et al. (2008) informaron **69,7 % *in vivo*, 62,3 % *in vitro***, y apenas **40,4 %** en el sistema TIM (6 h). En conjunto, estos datos muestran cómo el mayor contenido de fibra insoluble y la baja proporción de almidón reducen significativamente la digestibilidad, y cómo los métodos *in vitro* tienden a **sobreestimar la capacidad de digestión ileal en ingredientes altamente fibrosos**, al no reproducir totalmente las restricciones físicas presentes *in vivo*.

### Proteicos

De forma similar a lo observado con los cereales, los resultados de **digestibilidad ileal *in vitro*** para los ingredientes proteicos fueron comparados con valores disponibles en la literatura para **cerdos en crecimiento**. Esta comparación permite comprender las diferencias en el **aprovechamiento digestivo** atribuibles tanto a la naturaleza del ingrediente como al estado fisiológico del animal.

Tal como se ha mencionado, los valores de **digestibilidad total** reportados en la bibliografía incluyen la **acción fermentativa del intestino grueso** y, por lo tanto, **tienden a sobreestimar la digestibilidad real**. Este efecto es especialmente evidente en ingredientes con mayor contenido de fibra o compuestos anti nutricionales. Asimismo, las **condiciones más restrictivas del modelo *in vitro*** (tratamiento C: pH 4,0 y baja carga enzimática) parecen reflejar de forma más precisa la **fisiología digestiva de lechones recién destetados**, en contraste con los cerdos en crecimiento, que poseen una **mayor capacidad enzimática y de acidificación gástrica**.

En las siguientes tablas (Tabla N.º 42 y 43) de igual manera, se presenta la **comparativa** entre los resultados ***in vivo* en lechones**, los ***in vitro* STD y ALT C**, con

los publicados por Boisen y Fernández 1997 y 2007, y los **valores de tablas** disponibles para cerdos en crecimiento (*Feed Tables (INRAE-CIRAD-AFZ, 2020); Tablas Brasileñas 2024 (Rostagno et al., 2024)*).

*Tabla N.º 29: Comparativa de los resultados respecto a cerdos en crecimiento para la MS de proteicos.*

| MS-MO<br>Ingrediente | In Vivo<br>dMS %<br>(ileal) | In Vitro (ileal) |       | Cerdos en Crecimiento (MO) (total) (**ileal) |       |           |               |
|----------------------|-----------------------------|------------------|-------|--|-------|-----------|---------------|
|                      |                             | STD              | ALT-C | ** In Vivo                                   | * STD | * In Vivo | ° FT - ‡ TB   |
| <b>SBM</b>           | 0,667                       | 0,738            | 0,633 | 0,720  | 0,902 | 0,842     | 0,863 - 0,812 |
| <b>ASOY</b>          | 0,681                       | 0,793            | 0,728 | 0,850  | 0,959 | 0,915     | 0,896 - 0,894 |
| <b>RSM</b>           | 0,658                       | 0,485            | 0,490 | 0,580  | 0,765 | 0,675     | 0,710 - 0,710 |
| <b>SFM</b>           | 0,718                       | 0,718            | 0,740 | 0,650  | 0,738 | 0,643     | 0,668 - 0,480 |

\* Boisen & Fernandez 1997 \*\* Boisen & Fernandez 2007 ° Feed Tables ‡ Tablas Brasileñas  
(Respecto a los valores de SFM de publicaciones y tablas, no es un concentrado proteico como el de este experimento, sino que hacen referencia a harina de girasol descascarillada)

*Tabla N.º 30: Comparativa de los resultados de la digestibilidad de la PB.*

| PB<br>Ingrediente | In Vivo<br>dPB % (ileal) | In Vitro (ileal) |       | Cerdos en Crecimiento (PB) |               |
|-------------------|--------------------------|------------------|-------|----------------------------|---------------|
|                   |                          | STD              | ALT-C | ** In Vivo                 | ° FT - ‡ TB   |
| <b>SBM</b>        | 0,595                    | 0,890            | 0,628 | 0,950                      | 0,873 - 0,902 |
| <b>ASOY</b>       | 0,641                    | 0,928            | 0,785 | 0,950                      | 0,900 - 0,926 |
| <b>RSM</b>        | 0,564                    | 0,788            | 0,723 | 0,860                      | 0,766 - 0,766 |
| <b>SFM</b>        | 0,716                    | 0,928            | 0,855 | 0,960                      | 0,780 - 0,845 |

\* Boisen & Fernandez 1997 \*\* Boisen & Fernandez 2007 ° Feed Tables ‡ Tablas Brasileñas

En conjunto, los resultados evidencian que los **valores de digestibilidad in vitro ALT-C son inferiores** a los obtenidos **in vivo en cerdos en crecimiento** y los del **STD se asemejan**, lo cual es esperable dadas las **limitaciones fisiológicas simuladas** (pH menos ácido, menor actividad enzimática). No obstante, en algunos ingredientes con **alta solubilidad proteica o bajo contenido de fibra**, se observa una **mayor aproximación a los valores reales**, e incluso una **ligera sobreestimación** en los tratamientos más favorables. Estos resultados resaltan la importancia de **seleccionar condiciones digestivas que reflejen con precisión la fisiología del animal objetivo**, especialmente en el caso de lechones recién destetados. El **tratamiento C**, al combinar **pH moderado (4,0)** con **baja concentración enzimática**, da indicios de ser la **simulación más adecuada**, permitiendo **estimaciones más realistas del comportamiento digestivo** de distintos ingredientes proteicos en esa etapa productiva.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

Las diferencias observadas entre ingredientes dentro de los grupos evaluados pueden atribuirse, en gran medida, a características asociadas con la **cinética de degradación** y la **composición estructural** de cada ingrediente.

En el grupo de **cereales**, al comparar el **trigo** con la **cebada**, se observa que el primero mostró una **mayor estabilidad digestiva** frente a las modificaciones metodológicas. Esta diferencia puede explicarse por su **menor contenido de ADF** (fibra celulósica), y un nivel similar de NDF, junto con un **contenido levemente superior de almidón**, lo que le otorga una matriz estructural más accesible para las enzimas (Gallant et al., 1992). Además, es de conocimiento difundido que el almidón del trigo posee una **cinética de digestión más rápida** que el de la cebada, lo que explicaría su menor sensibilidad a las variaciones de pH y concentración enzimática en este estudio, aspecto que podría visualizarse análogamente en los parámetros de cinética de desgracian en rumiantes como lo es el “valor c” velocidad de degradación del almidón (FeedTables  $c = 0,39 \text{ h}^{-1}$ ).

Cuando se compara el **trigo con el maíz**, las diferencias se acentúan. El maíz presentó una mayor caída en los coeficientes de digestibilidad, especialmente en la fracción de almidón. Este comportamiento es consistente con su naturaleza **vítreo**, que genera un almidón **más compacto, menos accesible y mayor relación amilosa:amilopectina** (Eliasson y Gudmundsson, 1996). Por ende, una **cinética de degradación lenta**, en el mismo sentido este presenta un valor c de  $0,055 \text{ h}^{-1}$ . Esta estructura resistente dificulta la acción enzimática, particularmente cuando las condiciones de incubación se alejan del estándar, como ocurrió en los tratamientos modificados.

Finalmente, si se analiza la diferencia entre **cebada y cebada extrusionada (CE)**, se observan algunas mejoras en los valores de digestibilidad en CE, aunque no todas alcanzan significación estadística. Este resultado sugiere que el proceso de extrusión logra **incrementar parcialmente la accesibilidad del almidón, pero no altera sustancialmente la cinética general de degradación** del ingrediente. La extrusión, si bien rompe estructuras físicas y reduce la resistencia mecánica, no modifica en gran medida la complejidad del grano en términos de digestibilidad (Gil et al., 2013; Vicente et al., 2009; Anguita et al., 2006).

Estos aspectos discutidos para los cereales están en concordancia con lo publicado por diversos autores (McCleary et al., 2004; Eliasson y Gudmundsson, 1996; Gallant et al., 1992; Jenkins et al., 1987), que enfatizan en que la hidrolisis del almidón es muy dependiente del tipo de granulo, matriz proteica entorno al granulo, y relación amilosa:amilopectina

En el caso de los **ingredientes proteicos**, se destaca en primer lugar la diferencia entre **SFM** y **SBM**. El **SFM** mostró una alta digestibilidad y una baja sensibilidad frente a las condiciones modificadas, lo cual puede atribuirse a su **alta concentración de PB**, bajo contenido de fibra, y a su origen industrial, que genera una **estructura de matriz más abierta y fácilmente degradable**. La velocidad con que el SFM libera su proteína en medios enzimáticos ha sido documentada como superior a la de otras fuentes vegetales, de igual manera se puede hacer una analogía con la cinética de degradación en rumiantes. La velocidad de degradación de la proteína de SFM es superior a la de SBM,  $c = 0,16 \text{ h}^{-1}$  y  $0,085 \text{ h}^{-1}$  respectivamente (Feedtables).

En comparación, la **SBM** se vio más afectada por las modificaciones metodológicas. Esto podría deberse a que presenta una **cinética de digestión intermedia**, con una mayor proporción de componentes estructurales que retardan la acción enzimática, especialmente cuando la disponibilidad de enzimas es limitada o el pH no es óptimo.

En segundo lugar, la comparación entre **SFM** y **colza (RSM)** refuerza esta interpretación. La colza fue el ingrediente con **menor digestibilidad** y **menor sensibilidad** a las variaciones del protocolo. Esto puede explicarse por su **alto contenido de fibra** y la presencia de **compuestos anti nutricionales**, como glucosinolatos y taninos, que interfieren con la hidrólisis proteica, aspecto que se evidencia al continuar la comparación con el valor de  $c$ , el cual es de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . La matriz de la colza representa una barrera importante para la liberación de nutrientes, especialmente en condiciones digestivas subóptimas.

Finalmente, al comparar **SBM con ASOY**, se esperaría una mejora en la digestibilidad de esta última, al tratarse de un **concentrado proteico que ha recibido un tratamiento industrial**. Sin embargo, estos resultados no muestran una ventaja clara. Esto sugiere que, si bien el proceso industrial puede aumentar el contenido de PB, **no necesariamente se reflejan sustancialmente en la degradación** de la proteína en condiciones in vitro.

En conjunto, estos hallazgos permiten generar **hipótesis sobre la velocidad de digestión y la accesibilidad enzimática** de distintos ingredientes, pero también dejan abierta la necesidad de realizar nuevos estudios. Resulta pertinente avanzar hacia evaluaciones basadas en **curvas de digestión por tiempo**, así como incorporar **técnicas complementarias** (como microscopía estructural o fraccionamiento secuencial) que permitan **caracterizar mejor la cinética y los puntos críticos de degradación** bajo diferentes condiciones.

## **CONCLUSIÓN**

El método de digestibilidad in vitro de Boisen y Fernández 1997, tiende a **sobreestimar la digestibilidad en animales en crecimiento, y también claramente en lechones al destete** que presentan limitantes fisiológicas muy inferiores.

Las **propuestas alternativas al método STD demostraron generar diferencias al variar el pH y la concentración enzimática**, siendo la **combinación de ambas variables la que en términos generales se aproxima mejor a la digestibilidad ileal in vivo en lechones al destete**, al menos en base a los resultados con los que se contaron en este análisis.

La **combinación de las ventajas del método Daisy y los ajustes propuestos al protocolo standard de referencia pueden ampliar el conocimiento en un futuro y posiblemente consolidarse como una herramienta de uso difundido y práctico**; no obstante, es necesario continuar investigando y validando la técnica para conocer los límites y la precisión de esta.

## **ANEXO**

### **I. DIETAS**

I.1 - Composición dieta experimental experimento in vivo cereales (J. F. Pérez Hernández)

| Ingrediente         | Trigo | Cebada | Maíz | Cebada Ext. |
|---------------------|-------|--------|------|-------------|
| CARBONATO CALCICO   | 0,90  | 1,05   | 0,90 | 1,00        |
| FOSFATO MONOCALCICO | 1,50  | 1,35   | 1,65 | 1,45        |

|                                   |       |       |       |       |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>SAL</b>                        | 0,80  | 0,80  | 0,80  | 0,80  |
| <b>DL METIONINA</b>               | 0,40  | 0,45  | 0,55  | 0,45  |
| <b>L-LISINA HCL</b>               | 1,57  | 1,48  | 1,71  | 1,48  |
| <b>L-TREONINA</b>                 | 0,65  | 0,62  | 0,72  | 0,62  |
| <b>L-TRIPTOFANO</b>               | 0,12  | 0,12  | 0,20  | 0,12  |
| <b>L-VALINA</b>                   | 0,36  | 0,30  | 0,50  | 0,32  |
| <b>ISOLEUCINA 70 -VAL 30</b>      | 0,60  | 0,68  | 0,85  | 0,65  |
| <b>SACAROSA</b>                   | 1,00  | 1,00  | 1,00  | 1,00  |
| <b>ASN PRESTARTER PIGLET 0.5%</b> | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  |
| <b>TRIGO</b>                      | 91,60 |       |       |       |
| <b>CEBADA</b>                     |       | 91,65 |       |       |
| <b>MAIZ</b>                       |       |       | 90,62 |       |
| <b>CEBADA EXTRUDIDA</b>           |       |       |       | 91,61 |

I.2 - Composición dieta experimental experimento in vivo proteicos (J. F. Pérez Hernández)

| Ingrediente                      | Maíz  | SBM   | ASOY  | RSM   | SFM   |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>CALCIUM CARBONATE</b>         | 0,42  | 0,32  | 0,32  | 0,32  | 0,32  |
| <b>MONOCALCIUM PHOSPHATE</b>     | 1,45  | 1,09  | 1,09  | 1,09  | 1,09  |
| <b>SALT</b>                      | 0,67  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  |
| <b>L-LYSINE HCL</b>              | 1,33  | 1,00  | 1,00  | 1,00  | 1,00  |
| <b>ASN PRE-START PIGLET 0.5%</b> | 0,67  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  |
| <b>MAIZE</b>                     | 95,46 | 71,59 | 71,59 | 71,59 | 71,59 |
| <b>SOYBEAN MEAL</b>              |       | 25,00 |       |       |       |
| <b>ALPHA SOY</b>                 |       |       | 25,00 |       |       |
| <b>RAPSEED MEAL</b>              |       |       |       | 25,00 |       |
| <b>SUNFLOWER MEAL</b>            |       |       |       |       | 25,00 |

I.3 - Composición dieta adaptación experimento in vivo cereales (J. F. Pérez Hernández)

| Ingrediente                | Trigo | Cebada | Maíz | Cebada Ext. |
|----------------------------|-------|--------|------|-------------|
| <b>CARBONATO CALCICO</b>   | 0,96  | 1,05   | 0,90 | 1,02        |
| <b>FOSFATO MONOCALCICO</b> | 1,50  | 1,30   | 1,70 | 1,35        |
| <b>SAL</b>                 | 0,80  | 0,80   | 0,80 | 0,80        |
| <b>DL METIONINA</b>        | 0,12  | 0,15   | 0,25 | 0,15        |
| <b>L-LISINA HCL</b>        | 0,62  | 0,54   | 0,73 | 0,52        |

|                            |              |       |       |              |
|----------------------------|--------------|-------|-------|--------------|
| L-TREONINA                 | 0,25         | 0,23  | 0,31  | 0,23         |
| L-TRIPTOFANO               |              |       | 0,08  |              |
| ISOLEUCINA 70 -VAL 30      |              |       | 0,10  |              |
| SACAROSA                   | 1,00         | 1,00  | 1,00  | 1,00         |
| ASN PRESTARTER PIGLET 0.5% | 0,50         | 0,50  | 0,50  | 0,50         |
| CASEINA                    | 10,00        | 10,00 | 10,00 | 10,00        |
| <b>TRIGO</b>               | <b>84,25</b> |       |       |              |
| CEBADA                     |              | 84,43 |       |              |
| MAIZ                       |              |       | 83,63 |              |
| <b>CEBADA EXTRUDIDA</b>    |              |       |       | <b>84,43</b> |

I.4 - Composición dieta adaptación experimento in vivo proteicos (J. F. Pérez Hernández)

| Ingrediente               | Maíz  | SBM   | ASOY  | RSM   | SFM   |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CALCIUM CARBONATE         | 0,26  | 0,28  | 0,26  | 0,24  | 0,34  |
| MONOCALCIUM PHOSPHATE     | 1,70  | 1,55  | 1,38  | 1,37  | 1,35  |
| SALT                      | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  |
| L-LYSINE HCL              | 1,36  | 0,96  | 0,90  | 1,19  | 1,19  |
| DL METHIONINE             | 0,24  | 0,17  | 0,16  | 0,19  | 0,16  |
| L-THREONINE               | 0,58  | 0,39  | 0,35  | 0,48  | 0,46  |
| L-TRYPTOPHANE             | 0,23  | 0,16  | 0,14  | 0,20  | 0,17  |
| L-VALINE                  | 0,34  | 0,20  | 0,14  | 0,27  | 0,23  |
| ISOLEUCINE 70 -VAL 30     | 0,57  | 0,23  | 0,25  | 0,44  | 0,35  |
| CASEIN                    | 11,00 | 5,00  | 3,00  | 9,00  | 8,00  |
| SOYA OIL                  |       |       |       | 0,30  |       |
| ASN PRE-START PIGLET 0.5% | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  | 0,50  |
| MAIZE                     | 82,73 | 77,57 | 79,92 | 75,32 | 76,76 |
| SOYBEAN MEAL              |       | 12,50 |       |       |       |
| ALPHA SOY                 |       |       | 12,50 |       |       |
| RAPESEED MEAL             |       |       |       | 10,00 |       |
| SUNFLOWER MEAL            |       |       |       |       | 10,00 |

## II. ANALISIS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA

II.1 - Análisis de actividad enzimática diferentes lotes utilizados de pancreatina : A, B, E x4 U.S.P. y Control 8 U.S.P.

|           | Lote          |               |               |
|-----------|---------------|---------------|---------------|
|           | Pancreatina A | Pancreatina B | Pancreatina E |
| 0,5 mg/ml | 2,98          | 3,28          | 3,61          |
|           | 3,12          | 3,32          | 3,86          |
| Media     | <b>3,05</b>   | <b>3,30</b>   | <b>3,73</b>   |

|                   |             |             |             |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>0,75 mg/ml</b> | 3,00        | 3,11        | 3,85        |
|                   | 2,81        | 3,14        | 3,89        |
|                   | 2,99        |             |             |
| <b>Media</b>      | <b>2,93</b> | <b>3,13</b> | <b>3,87</b> |
| <b>Control</b>    |             |             |             |
| <b>1mg/ml</b>     | <b>8,31</b> |             |             |

## II.2 - Análisis de actividad enzimática pepsina para el lote utilizado.

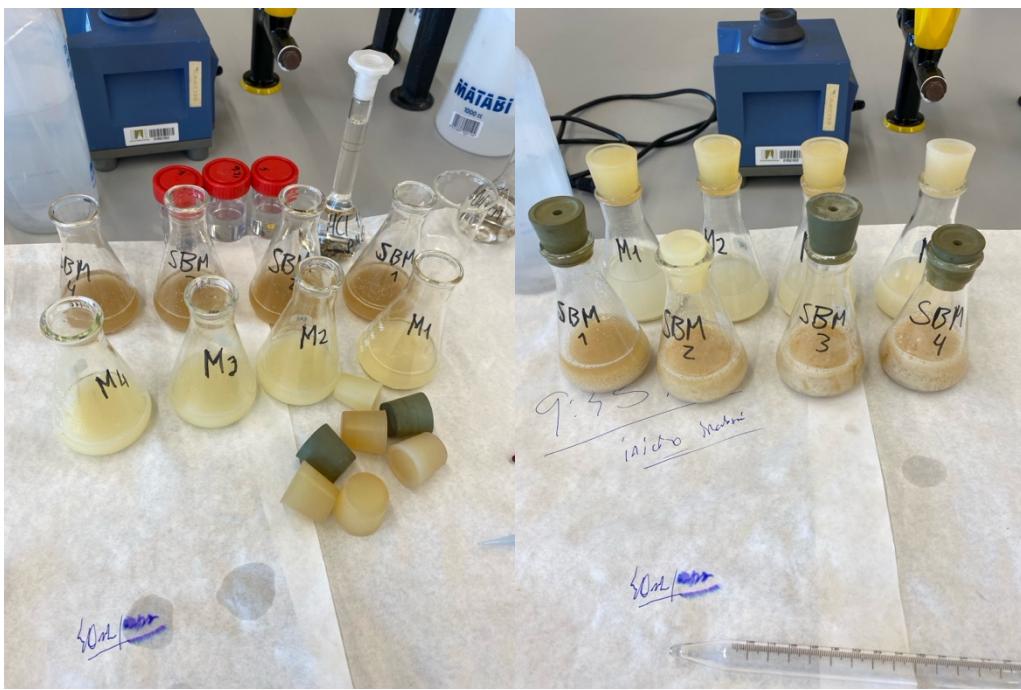
| CURVA | INICIAL<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Individual | ACTIVIDAD<br>(U/mg) |      |
|-------|---------------------------------|------------|---------------------|------|
|       |                                 |            | MEDIA               | % DS |
| 2     | 20                              | 3621       | <b>3677</b>         | 1,91 |
| 3     | 25                              | 3723       |                     |      |
| 4     | 30                              | 3613       |                     |      |
| 5     | 35                              | 3751       |                     |      |

## III. FOTOS

### III.1- Dietas del experimento in vivo proteicos. (ingredientes contrastantes SFM, SBM)



### III.2 – Incubación en matraces con método de referencia. (pruebas previas)

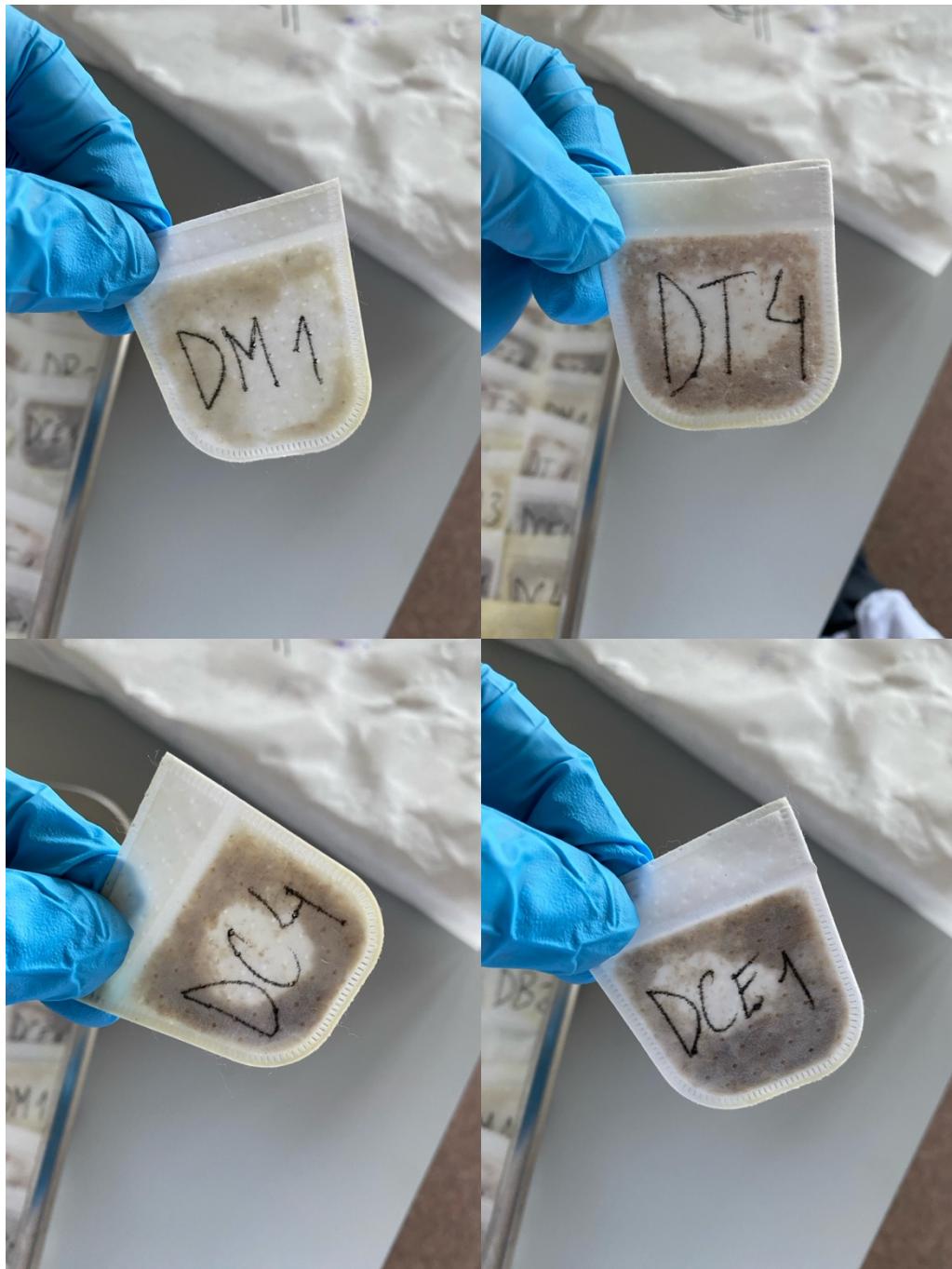


III.3 – Incubación en Daisy II en bolsas F-57.



III.4 – Bolsas de polyester F-57 ANKOM ® 25 micras de poro.

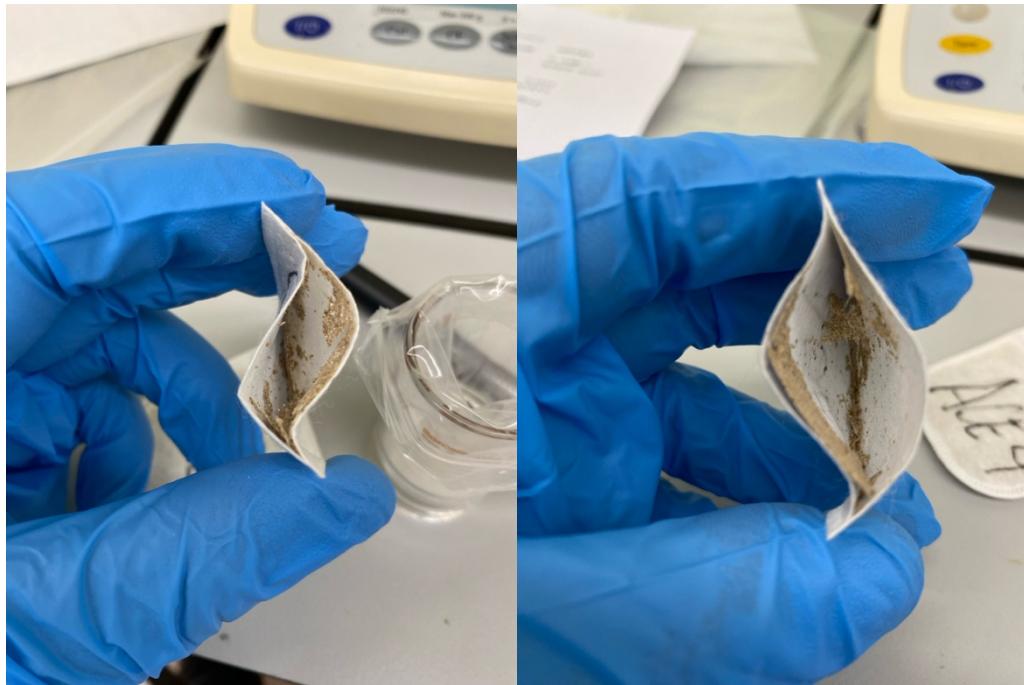
Digestión Maíz, Tigo, Cebada y Cebada Extrusionada con el protocolo standard adaptado



III.5 – Bolsas tipo A: F-58 (8 micras), B: F-57 (25 micras) y C: R55 (50 micras), luego de digestión con pepsina y pancreatina con el protocolo STD. (pruebas previas)



III.6 – Residuo post digestión ileal en bolsa F-57 del tratamiento A para cebada extrusionada.



III.7 – Distribución homogénea de la muestra (0,5g) en bolsa F-57.  
Factor muy importante.



III.8 – Residuo de incubación con 1,5 g de muestra inicial luego del lavado. (nótese la diferencia de espesor de los diferentes ingredientes por retención de agua)  
M1: Maíz; CP: pulpa citrus; WB2: salvado; BP2: pulpa de remolacha; SH: cascarilla de soja. (pruebas previas)



#### IV- PROCEDIMIENTO DIGESTION KJELDAHL (AJUSTE DE TEMPERATURA Y TIEMPO)

##### IV.1 - Extracto de PNT – UAB

- “Precalentar a 200°C y subir a 420°C durante 45min. (según la bibliografía es el método recomendado)”

##### IV.2 - Recomendaciones de ANKOM para bolsas F-57

- Step 1 (preheat)- 200C, 0mins
- Step 2 (clearing)-300C, 15mins
- Step 3 (digesting)- 420C, 105mins
- Step 4 (cooling)-30mins

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abad Guamán, R. M. (2015). Identification of the method to quantify soluble fibre and the effect of the source of fibre on the ileal and faecal digestibility of soluble and insoluble fibre in rabbits [PhD, E.T.S.I. Agrónomos (UPM)].  
<https://oa.upm.es/38062/>
- Aguilera, A., Mariscal, G., & Souza, T. (2005). Efecto de diferentes cereales en dietas de iniciación para lechones sobre la digestibilidad de los nutrientes y la preferencia alimentaria. Veterinaria Mexico.
- Anguita, M., Gasa, J., Martín-Orúe, S. M., & Pérez, J. F. (2006). Study of the effect of technological processes on starch hydrolysis, non-starch polysaccharides solubilization and physicochemical properties of different ingredients using a two-step in vitro system. *Animal Feed Science and Technology*, 129(1-2), 99-115. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.12.004>
- Aumaitre, A., Corring, T., & Durand, G. (1978). Development of Digestive Enzymes in the Piglet from Birth to 8 Weeks: I. Pancreas and Pancreatic Enzymes. *Nutrition and Metabolism*, 22(4), 231-243. <https://doi.org/10.1159/000176219>
- Boisen, S. (1998). A new protein evaluation system for pig feeds and its practical application. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, 48(1), 1-11. <https://doi.org/10.1080/09064709809362397>
- Boisen, S. (2007a). A new concept for practical feed evaluation systems.
- Boisen, S. (2007b). In vitro analyses for predicting standardised ileal digestibility of protein and amino acids in actual batches of feedstuffs and diets for pigs. *Livestock Science*, 109(1-3), 182-185.  
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.141>

- Boisen, S., & Eggum, B. O. (1991). Critical Evaluation of in Vitro Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. *Nutrition Research Reviews*, 4(1), 141-162. <https://doi.org/10.1079/NRR19910012>
- Boisen, S., & Fernández, J. A. (1995). Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by in vitro analyses. *Animal Feed Science and Technology*, 51(1-2), 29-43. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)00686-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)00686-4)
- Boisen, S., & Fernández, J. A. (1997). Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Animal Feed Science and Technology*, 68(3-4), 277-286. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00058-8)
- Bornhorst, G. M., Chang, L. Q., Rutherford, S. M., Moughan, P. J., & Singh, R. P. (2013). Gastric emptying rate and chyme characteristics for cooked brown and white rice meals in vivo: Gastric emptying and chyme traits of cooked brown and white rice in vivo. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2900-2908. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6160>
- Cervantes-Pahm, S. F. (2011). In vitro and in vivo disappearance of energy and nutrients in novel carbohydrates and cereal grains by pigs [PhD, University of Illinois at Urbana-Champaign]. <https://nutrition.anisci.illinois.edu/sites/default/files/DissertationSPahm.pdf>
- Chen, H., Wierenga, P. A., Hendriks, W. H., & Jansman, A. J. M. (2019). In vitro protein digestion kinetics of protein sources for pigs. *Animal*, 13(6), 1154-1164. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002811>
- Cho, J. H., & Kim, I. H. (2011). Evaluation of the Apparent Ileal Digestibility (AID) of Protein and Amino Acids in Nursery Diets by In vitro and In vivo Methods.

- Chu K. S., Kim J. H., Chae B. J., Chung Y. K., Han In K. (1998). Effects of processed barley on growth performance and ileal digestibility of growing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*, 11(3), 249-254. <https://doi.org/10.5713/ajas.1998.249>
- Cranwell, P. D. (1985). The development of acid and pepsin (EC 3. 4. 23. 1) secretory capacity in the pig; the effects of age and weaning: 1. Studies in anaesthetized pigs. *British Journal of Nutrition*, 54(1), 305-320.  
<https://doi.org/10.1079/BJN19850113>
- Cranwell, P., & Moughan, P. (1989). Biological limitations imposed by the digestive system to the growth performance of weaned pigs. *Manipulating pig production II*, 140-165.
- Danicke, S., Vahjen, W., Simon, O., & Jeroch, H. (1999). Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium. On transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poultry Science*, 78(9), 1292-1299.  
<https://doi.org/10.1093/ps/78.9.1292>
- Efird, R. C., Armstrong, W. D., & Herman, D. L. (1982). The Development of Digestive Capacity in Young Pigs: Effects of Weaning Regimen and Dietary Treatment. *Journal of Animal Science*, 55(6), 1370-1379.  
<https://doi.org/10.2527/jas1982.5561370x>

- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M. J., Le Feunteun, S., JanssenDuijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A. R., ... Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217-225.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006>
- Egger, L., Schlegel, P., Baumann, C., Stoffers, H., Guggisberg, D., Brügger, C., Dürr, D., Stoll, P., Vergères, G., & Portmann, R. (2017). Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion. *Food Research International*, 102, 567-574.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.047>
- Eliasson, A.-C., Gudmundsson, M., (1996). Starch: physicochemical and functional aspects. In: Eliasson, A.C. (Ed.), *Carbohydrates in Food*. Marcel Dekker Inc., Lund, Sweden, pp. 431–504.
- De Blas, C., García-Rebollar, P., Gorrachategui, M., & Mateos, G. G. (2019). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (4<sup>a</sup> ed.). Madrid: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Fuller, M. F. (1991). In vitro digestion for pigs and poultry.
- Gallant, D. J., Bouchet, B., Buléon, A., & Perez, S. (1992). Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European journal of clinical nutrition*, 46(2), 3-16.

- Gargallo, S., Calsamiglia, S., & Ferret, A. (2006). Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of Animal Science*, 84(8), 2163-2167. <https://doi.org/10.2527/jas.2004-704>
- Gil, A., de Blas, C., Gasa, J., & Mateos, G. G. (2013). Influencia del extrusionado de cereales sobre la digestibilidad ileal de nutrientes en lechones. XV Jornadas sobre Producción Animal, 105-107. [https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/comunicaciones/2013\\_NyA\\_10.pdf](https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/comunicaciones/2013_NyA_10.pdf)
- Gutiérrez, T. J., & Tovar, J. (2021). Update of the concept of type 5 resistant starch (RS5): Self-assembled starch V-type complexes. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 711-724. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.078>
- Ha, D. U., Choi, H., & Kim, B. G. (2020). Supplemental protease improves in vitro disappearance of dry matter and crude protein in feather meal and copra meal for pigs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49, e20200095. <https://doi.org/10.37496/rbz4920200095>
- Hall, M. B., & Mertens, D. R. (2023). Comparison of alternative neutral detergent fiber methods to the AOAC definitive method. *Journal of Dairy Science*, 106(8), 5364-5378. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22847>
- Hampson, D. J., & Kidder, D. E. (1986). Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Research in Veterinary Science*, 40(1), 24-31. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30481-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30481-8)
- Hartman, P. A., Hays, V. W., Baker, R. O., Neagle, L. H., & Catron, D. V. (1961). Digestive Enzyme Development in the Young Pig. *Journal of Animal Science*, 20(1), 114-123. <https://doi.org/10.2527/jas1961.201114x>

- Hedemann, M., & Jensen, B. (2004). Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. *Archives of Animal Nutrition*, 58(1), 47-59. <https://doi.org/10.1080/00039420310001656677>
- Huang, G., Sauer, W. C., He, J., Hwangbo, J., & Wang, X. (2003). The nutritive value of hulled and hulless barley for growing pigs. 1. Determination of energy and protein digestibility with the in vivo and in vitro method. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 12(4), 759-769. <https://doi.org/10.22358/jafs/67771/2003>
- INRAE-CIRAD-AFZ. (2020). INRA-CIRAD-AFZ Feed Tables: Tables of Composition and Nutritional Values of Feed Materials.  
<https://www.feedtables.com/content/tables>
- Jenkins, D. J., Thorne, M. J., Wolever, T. M., Jenkins, A. L., Rao, A. V., & Thompson, L. U. (1987). The effect of starch-protein interaction in wheat on the glycemic response and rate of in vitro digestion. *The American journal of clinical nutrition*, 45(5), 946-951.
- Kim, H. Y., Moon, J.-O., & Kim, S. W. (2024). Development and application of a multi-step porcine in vitro system to evaluate feedstuffs and feed additives for their efficacy in nutrient digestion, digesta characteristics, and intestinal immune responses. *Animal Nutrition*, 17, 265-282.  
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.01.006>
- Lecce, J. G., Clare, D. A., Balsbaugh, R. K., & Collier, D. N. (1983). Effect of dietary regimen on rotavirus-Escherichia coli weanling diarrhea of piglets. *Journal of Clinical Microbiology*, 17(4), 689-695. <https://doi.org/10.1128/jcm.17.4.689-695.1983>
- Lehninger, A. L. (1990). Bioquímica (2.a ed.). Ediciones Omega.

Li, Y., Zhang, A. R., Luo, H. F., Wei, H., Zhou, Z., Peng, J., & Ru, Y. J. (2015). In vitro and in vivo digestibility of corn starch for weaned pigs: Effects of

amylose:amylopectin ratio, extrusion, storage duration, and enzyme supplementation1. *Journal of Animal Science*, 93(7), 3512-3520.

<https://doi.org/10.2527/jas.2014-8790>

McCleary, B. V., Rossiter, P., Charnock, S., & Lloyd, R. (2004). Rapid bio-analytical methods-New developments. *Dietary Fiber*, 69.

McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2022). *Animal nutrition* (Eighth edition). Pearson.

Medel, P. (2000). Efecto del procesado de la cebada en dietas para lechones destetados precozmente [PhD Thesis, Universidad Politécnica de Madrid].

<https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.594>

Mertens, D. R. (2002). Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 85(6), 1217-1240.

<https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>

Meunier, J. P., Manzanilla, E. G., Anguita, M., Denis, S., Pérez, J. F., Gasa, J., Cardot, J.-M., Garcia, F., Moll, X., & Alric, M. (2008). Evaluation of a dynamic in vitro model to simulate the porcine ileal digestion of diets differing in carbohydrate composition1. *Journal of Animal Science*, 86(5), 1156-1163.

<https://doi.org/10.2527/jas.2007-0145>

- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Molist, F., Van Oostrum, M., Pérez, J. F., Mateos, G. G., Nyachoti, C. M., & Van Der Aar, P. J. (2014). Relevance of functional properties of dietary fibre in diets for weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 189, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.12.013>
- Moughan, P. J. (1999). In vitro techniques for the assessment of the nutritive value of feed grains for pigs: A review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(5), 871. <https://doi.org/10.1071/AR98172>
- OpenAI (Versión GPT-4 (Plus)). (2024). [Software]. OpenAI. <https://chat.openai.com/chat>
- Ospinal, D., Ciro', J., Romdn, Y., Peldez, C., & Lopez', A. (2011). Cambios en la actividad enzimaica en duodeno y yeyuno en cerdos durante varios periodos posdestete.
- Owsley, W. F., Orr, D. E., & Tribble, L. F. (1986). Effects of Nitrogen and Energy Source on Nutrient Digestibility in the Young Pig. *Journal of Animal Science*, 63(2), 492-496. <https://doi.org/10.2527/jas1986.632492x>
- Pérez-Vendrell, A. M., & Torrallardona, D. (2010). In vitro digestibility kinetics of diets containing different cereal sources. *Livestock Science*, 134(1-3), 47-49. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.093>

Regmi, P. R., Ferguson, N. S., & Zijlstra, R. T. (2009). In vitro digestibility techniques to predict apparent total tract energy digestibility of wheat in grower pigs12.

Journal of Animal Science, 87(11), 3620-3629. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1739>

Rosenfelder-Kuon, P., Strang, E. J. P., Spindler, H. K., Eklund, M., & Mosenthin, R.

(2017). Ileal starch digestibility of different cereal grains fed to growing pigs.

Journal of Animal Science, 95(6), 2711. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1450>

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Calderano, A. A., Hannas, M. I., Sakomura, N. K.,

Perazzo, F. G., Rocha, G. C., Saraiva, A., Teixeira de Abreu, M. L., Genova, J.

L., & Tavernar, F. C. (2024). Tablas Brasileñas para Aves y Cerdos:

Composición de Alimentos y Requerimientos Nutricionales (5.a ed.).

Universidad Federal de Viçosa.

Sert, N. P. du, Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W.

J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T.,

Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J.,

Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated

guidelines for reporting animal research. PLOS Biology, 18(7), e3000410.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

Son, J., & Kim, B. G. (2023). Nutrient Digestibility of Soybean Meal Products Based on

In Vitro Procedures for Pigs. Agriculture, 13(8), Article 8.

<https://doi.org/10.3390/agriculture13081631>

Son, J., Park, N., & Kim, B. G. (2024). Energy utilization of corn, oilseed meals, and

fibrous ingredients can be predicted by multi-sample simultaneous in vitro assay

for growing pigs. Animal Feed Science and Technology, 309, 115903.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115903>

Song, Y. S., Kim, H., & Kim, B. G. (2024). Estimation of dry matter and crude protein residues originating from exogenous digestive enzymes based on the amounts of pepsin and pancreatin used in 2-step in vitro digestibility procedures for non-ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 309, 115895.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115895>

Ton Nu, M. A., Lupatsch, I., Zannatta, J. S., Schulze, H., & Zijlstra, R. T. (2020).

Thermomechanical and enzyme-facilitated processing of soybean meal enhanced in vitro kinetics of protein digestion and protein and amino acid digestibility in weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 98(8), skaa224.

<https://doi.org/10.1093/jas/skaa224>

Van Soest, P. J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2d. Edition. Cornell University Press. Ithaca and London.

Vicente, B., Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R., & Mateos, G. G. (2009). Effects of feeding rice and the degree of starch gelatinisation of rice on nutrient digestibility and ileal morphology of young pigs. *British Journal of Nutrition*, 101(09), 1278. <https://doi.org/10.1017/S0007114508060789>

Weurding, R. E., Veldman, A., Veen, W. A. G., Van Der Aar, P. J., & Verstegen, M. W. A. (2001). Starch Digestion Rate in the Small Intestine of Broiler Chickens Differs among Feedstuffs. *The Journal of Nutrition*, 131(9), 2329-2335.

<https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2329>

Xu, R. J., Wang, F., & Zhang, S. H. (2000). Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: A possible role of milk-borne growth factors. *Livestock Production Science*, 66(2), 95-107. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00217-7](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00217-7)

Zhang, S., De Vries, S., & Gerrits, W. J. J. (2024). Quantifying the effects of dietary fibres on protein digestibility in pigs—A review. *Animal Feed Science and Technology*, 308, 115864. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115864>