

Metodologías para determinar la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina



ARTÍCULO
DE REVISIÓN

Esteban Osorio-Carmona¹, John Giraldo-Carmona², William Narváez-Solarte³

¹ Universidad de Caldas, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Manizales, Colombia.

² Universidad de Caldas, Joven Investigador de Colciencias, Manizales, Colombia.

³ Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

freosorio105@gmail.com

(Recibido: octubre 6, 2011; aprobado: febrero 9, 2012)

ABSTRACT: La nutrición es uno de los campos más estudiados en la medicina veterinaria, no solamente en animales de abasto, sino también en animales de compañía; por tal motivo, es de gran importancia conocer la calidad y qué tan digestibles son las materias primas con las cuales se fabrican los alimentos balanceados, ya que de estas depende en gran medida el rendimiento y el bienestar para los animales. Por definición, la digestibilidad es la fracción de alimento consumido que no aparece en las heces y por lo tanto se absorbe en el tracto gastrointestinal; aunque se diferencian la digestibilidad aparente y la verdadera, la primera no incluye los aportes metabólicos y endógenos provenientes de enzimas, células epiteliales, células microbiales, metabolitos, entre otros, que llegan a la luz intestinal y son excretados en las heces, mientras que en la digestibilidad verdadera estas fracciones de origen metabólico y endógeno se descuentan de la fracción excretada en las heces para la realización de los cálculos. Para determinar el coeficiente de digestibilidad de un nutriente en un alimento existen métodos *in vivo* directos como la recolección total de heces, indirectos cuando se usan indicadores; métodos *in situ* como la canulación ileal y finalmente los métodos *in vitro* en los cuales se usan enzimas y técnicas de fermentación. Los diferentes métodos varían en precisión y mecanismos empleados para determinar los coeficientes de digestibilidad. Por lo tanto, el siguiente artículo tiene como objetivo describir las principales técnicas utilizadas en la determinación de la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina, y establecer las ventajas y desventajas de cada una de ellas para que los investigadores usen a su criterio la técnica que mejor se adapte a sus necesidades.

Key words: canulación, digestión, heces, perros, marcador.

Methodologies to determinate the digestibility of foods used in feeding dogs

ABSTRACT: Nutrition is one of the most documented fields in Veterinary Medicine, not just in food animals but also in small animal medicine, for this reason is the great importance to know the quality and digestibility of raws which are manufactured the balanced food, because animal welfare and performance are related to this. By definition, digestibility is the consumed food that is not present in feces, by the way is absorbed in gastrointestinal tract; although differing, apparent digestibility and true digestibility, the first one does not included the metabolic contribution and endogenous originated of the enzymatic activity, epithelial cells, microbial cells, metabolites among others, reaching the intestinal lumen and are excreted in feces, whereas in the true digestibility these fractions of metabolic and endogenous origin are discounted of the excreted fraction to make the calculations. To determine the apparent digestibility coefficient of a nutrient in a food there are *in vivo* methods directs such as the total feces recollection, indirect when indicators are used, *in situ* methods like ileal cannulation and finally *in vitro* methods in which enzymes are used and fermentation techniques. The different method varies in precision and employed mechanisms to determinate the digestibility coefficients. Therefore, the objective of this article is to describe the main techniques used in the digestibility determination of raws employed in dog foods and to establish the advantages and disadvantages of each one to the researches use that according to their needs.

Key words: cannulation, digestion, faeces, canine, marker.

Introducción

La digestibilidad es la base de las metodologías de evaluación de los alimentos, por definición, es la fracción de alimento consumido que no aparece en las heces y por lo tanto se absorbe en el tracto gastrointestinal (Stein et al., 2007). La digestibilidad sirve como una medida para determinar la calidad de la dieta y de las materias primas utilizadas en ella, la disponibilidad de los nutrientes que las constituyen, la importancia que tienen estos en la salud de los animales, su desempeño y las características de las heces, además sirve como soporte para el cálculo de los requerimientos nutricionales (Harmon, 2007).

Para calcular la digestibilidad de un alimento, es necesario tener en cuenta varios aspectos que pueden afectar los resultados, como por ejemplo, la especie vegetal o animal a la que pertenece el ingrediente, el procesamiento, la interacción entre los nutrientes de la dieta o ingrediente, el método analítico utilizado para determinar los valores de digestibilidad, así como también los factores ambientales y propios del individuo (Adesogan et al., 1998; Calabro et al., 2006; Jullian et al., 2006). Al no considerar los aspectos anteriormente citados se puede subvalorar o sobrevalorar el valor nutritivo de un ingrediente y así cometer errores al balancear la dieta, con efecto directo sobre la salud y el desempeño de los animales que la consumen (Bauer et al., 2001; Secombe & Lester, 2012). Algunos ingredientes con baja digestibilidad afectan el consumo de alimento, principalmente si se usan de manera inadecuada, comprometen el rendimiento de los animales por desequilibrio en el aprovechamiento de nutrientes contenidos en el alimento (Correa et al., 2010; Secombe & Lester, 2012), pero usados de manera adecuada, como las dietas ricas en fibra, favorecen la pérdida de peso de animales obesos o con problemas de saciedad, sin afectar negativamente la digestibilidad de los demás nutrientes (Weber et al., 2007).

La individualidad de cada animal afecta la digestibilidad de los nutrientes, es el caso del tiempo de duración del alimento en el tracto

gastrointestinal, pues en ocasiones, el tránsito es muy rápido para que se pueda realizar una acción digestiva completa, o es muy lento y puede conllevar a procesos de fermentación excesiva que se manifiestan en alteraciones gastrointestinales (Maynard, 1986); por lo tanto, se debe evitar el uso en la determinación de la digestibilidad de animales con dichos problemas, o la utilización de dietas desbalanceadas que los puedan generar, ya que se corre el riesgo de realizar una estimación errónea de la digestibilidad del nutriente, de la materia prima o la dieta (Nieves et al., 2008; Castrillo et al., 2009).

Debido a la importancia de la digestibilidad en la nutrición, se desarrollaron diversos métodos para evaluar un ingrediente en particular o una dieta balanceada en todos los nutrientes que la constituyen, el nivel de aprovechamiento y su efecto en el desempeño y en la salud del animal (Secombe & Lester, 2012). Por lo tanto, la presente investigación de tipo documental tiene como objetivo describir cuáles son las principales técnicas utilizadas en la determinación de la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina, y establecer las ventajas y desventajas de cada una de ellas para que los investigadores usen a su criterio la técnica que mejor se adapte a sus necesidades.

Metodologías usadas para determinar el coeficiente de digestibilidad en caninos

Digestibilidad aparente. Normalmente los valores de digestibilidad que se obtienen son valores aparentes, es decir, incluyen en las heces los aportes metabólicos y endógenos provenientes de enzimas, células epiteliales, células microbiales, metabolitos, entre otros, que llegan a la luz intestinal (Maynard, 1986; Stein et al., 2007), y que no fueron ofrecidos en el alimento.

Existen diversos métodos para evaluar la digestibilidad de las materias primas que son empleadas en las dietas ofrecidas a los animales de compañía, dentro de los cuales están los métodos *in vivo* directos como la recolección total de heces,

indirectos cuando se usan indicadores; métodos *in situ* como la canulación ileal y finalmente los métodos *in vitro* en los cuales se usan enzimas y técnicas de fermentación. Los diferentes métodos varían en precisión y mecanismos empleados para determinar los coeficientes de digestibilidad.

Digestibilidad mediante la recolección total de heces

Los ensayos de recolección total de heces, se caracterizan por el uso de animales en las investigaciones y por la recolección total de las heces que estos producen (Burrows et al., 1982; De Brito et al., 2010; Fortes et al., 2010). En este método, primero, se establecen los requerimientos nutricionales del animal según la raza, fase de desarrollo y estado fisiológico (NRC, 2006). Posteriormente, se procede a formular las dietas con las materias primas que se van a evaluar y se suministran a los animales durante por lo menos cinco días como periodo de adaptación, antes de dar inicio al periodo experimental, que puede ser de tres a cinco días (Gröner & Pfeffer, 1997; Silvio et al., 2000; Cavalari et al., 2006).

Alimentación. Los animales se alimentan por lo general dos veces al día, aunque la Asociación Americana de Controles Oficiales para la Alimentación – AAFCO (1992) afirma que el ingrediente o alimento debe ser ofrecido por lo menos una vez al día en una cantidad constante para mantener el peso corporal y las funciones basales de mantenimiento, u ofrecida *ad libitum*. Si se alimenta en la mañana y en la tarde, la ración diaria se pesa antes de ser ofrecida para pesar las sobras, al finalizar el día, y así determinar el consumo diario

de alimento y materia seca. La AAFCO (1992) hace algunas recomendaciones tanto para los alimentos, como para las metodologías utilizadas en la determinación de la digestibilidad: la dieta o la materia prima evaluada, debe ser ofrecida por lo menos a seis animales maduros, de mínimo un año de edad, que estén saludables y alojados individualmente. Los animales deben adaptarse a la dieta a evaluar en un período no inferior de cinco días (Carciofi et al., 2009; Correa et al., 2010; De Brito et al., 2010).

Después del periodo de adaptación se inicia el periodo de recolección total de heces, el cual tiene una duración variable dependiendo del diseño experimental empleado en el estudio, pero que por lo general es de tres a cinco días. La totalidad de las heces que se recolectan durante este periodo se deben acumular y mezclar únicamente con las heces de la misma unidad experimental, y diariamente se guardan a -15°C hasta el momento del secado, molido y toma de muestras para los análisis de laboratorio (Ham et al., 2000; Hilcko et al., 2009; Zanatta et al., 2011).

Reconocer el momento en el cual se debe iniciar y finalizar la recolección de las heces puede ser un inconveniente en este método, sin embargo se soluciona por medio de la adición de sustancias marcadoras al alimento que teñirán las heces que no hacen parte del estudio. El marcador se adiciona en la última ración del alimento del periodo de adaptación y en la primera ración que se suministre después de terminado el alimento experimental, de esta manera las heces que no deben ser recolectadas estarán teñidas y determinarán el inicio y la finalización de la recolección, como se ilustra en la Figura 1.

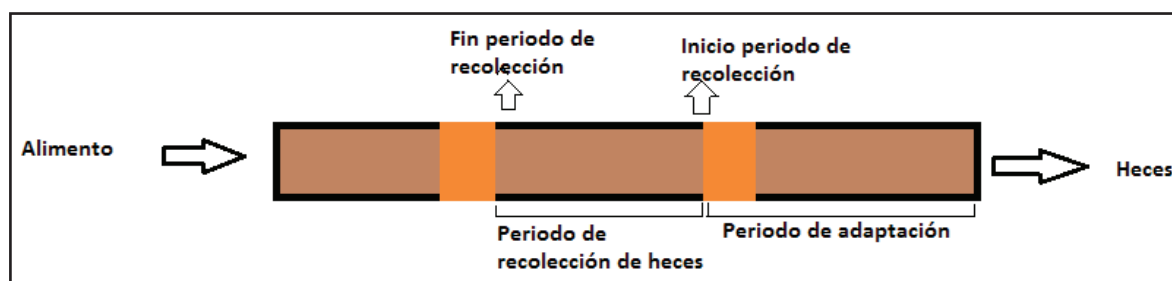


Figura 1. Uso de marcadores para recolección de heces en el método de recolección total de heces en caninos.

Entre los marcadores más frecuentes se encuentran el óxido férrico, a una concentración de 20 g/kg (Jagger et al., 1992).

Otro método para identificar el inicio y el fin de la recolección, es el mantener en ayuno a los animales durante un periodo que permita el vaciado del tracto gastrointestinal, y seguidamente se inicia la alimentación con la dieta experimental y la recolección de las heces; no se recomienda esta técnica si existe la posibilidad de utilizar marcadores, ya que durante este periodo de ayuno se ven alteradas las funciones digestivas y pueden alterar los resultados obtenidos.

Análisis de laboratorio

Terminado el periodo de recolección, las heces se descongelan, se homogenizan y se mezclan uniformemente para cada unidad experimental. Posteriormente se pesan y se secan en un horno de aire caliente a 75°C durante 72 horas, para determinar el contenido de materia seca, parte de la muestra es incinerada para determinar el contenido de ceniza y la cantidad de materia orgánica que contiene (Twomey et al., 2003; Carciofi et al., 2009; De Brito et al., 2010).

La muestra seca se muele a través de una criba de 1 mm o menos y se procede a realizar los análisis proximales tanto del alimento como de las heces. La energía bruta se determina por medio de una bomba calorimétrica, la proteína bruta mediante el método de Kjeldahl o un determinador de nitrógeno, el extracto etéreo en un sistema Soxhlet después de hidrólisis ácida (Kienzle et al., 2001; Krogdahl et al., 2004; Dobenecker et al., 2010; Nery et al., 2010), y el contenido de aminoácidos se determina por cromatografía de intercambio de iones (Eklund et al., 2012). Los valores de la materia orgánica son calculados por la diferencia entre la materia seca y la materia mineral (ceniza) tanto de los alimentos como de las heces (Diez et al., 1998; Zentek et al., 2004; Tavares et al., 2010).

Para obtener los coeficientes de digestibilidad aparente, se usa la siguiente fórmula que relaciona

la cantidad de alimento consumido, la cantidad de heces producidas y el contenido del nutriente que se pretende evaluar, tanto en heces como en el alimento (Stein et al., 2007). Todos los valores deben de usarse en base seca.

$$CDA = \frac{AC \times NC - CH \times NE}{AC \times NC} \times 100$$

CDA: Coeficiente de digestibilidad aparente.
AC: Cantidad de alimento consumido. CH: Cantidad de heces. NC: Concentración del nutriente consumido. NE: Concentración nutriente excretado.

Este método tiene la ventaja de proporcionar datos reales de lo que sucede en el organismo del animal en cuanto al proceso digestivo y al aprovechamiento de los nutrientes. Sin embargo algunas de sus desventajas son la posible contaminación de las heces por la orina (Nieves et al., 2008), la gran dificultad que existe para recoger la totalidad de las heces y los costos que estos experimentos acarrearán (Rodríguez et al., 2007). Finalmente la determinación de la digestibilidad por medio de la comparación del alimento con las heces, no distingue entre la digestión del intestino delgado de la fermentación del intestino grueso (Hill et al., 1996; Harmon, 2007), que es de gran importancia al evaluar una materia prima.

Digestibilidad verdadera. Con el fin de obtener información más aproximada al verdadero aprovechamiento de los nutrientes por parte del animal, se establece el concepto de digestibilidad verdadera en el cual se tiene en cuenta en los cálculos los valores endógenos, ya que se reconoció que parte de los nutrientes que se encuentran en las heces se derivan del animal y no son residuos del alimento (Maynard, 1986). Se puede calcular la digestibilidad verdadera de los alimentos teniendo en cuenta los aportes endógenos con la siguiente fórmula; se deben reemplazar con valores en base seca.

$$CDV = \frac{AC \times NC - ((CH \times NE) - PE)}{AC \times NC} \times 100$$

CDV: Coeficiente de digestibilidad verdadera.
 AC: Cantidad de alimento consumido. CH: Cantidad de heces. NC: Concentración del nutriente consumido. NE: Concentración nutriente excretado. PE: Pérdida endógena del nutriente.

Método de los Indicadores

Este método se constituye en una alternativa para determinar los coeficientes de digestibilidad de los nutrientes de los alimentos sin la obligación de recolectar la totalidad de las heces, y se basa en la adición de sustancias indicadoras en las dietas experimentales. Los indicadores empleados deben cumplir ciertas condiciones para su empleo en los ensayos, no deben ser absorbidos por el animal ni tener efecto en la digestión, ser fáciles de medir, tener la capacidad de ser procesados con el alimento, permanecer distribuidos en los contenidos del tracto digestivo, ser excretados por el animal sin ninguna alteración, no deben tener algún tipo de efecto fisiológico en el animal, se deben recuperar completamente tanto del alimento procesado como de las heces, no debe tener efectos sobre la población microbiana del animal y tener cualidades que permitan su medición precisa (Gutiérrez, 2000; Carciofi *et al.*, 2007; Buñay, 2010). Es muy importante aclarar que el indicador no se puede visualizar a simple vista en la dieta ni en las heces y debe ser determinado con métodos de laboratorio, no debe confundirse con los marcadores que sí pueden ser visualizados y se usan para indicar el inicio y el fin de la recolección en el método de recolección total de heces, sin embargo muchos autores utilizan indistintamente ambas palabras, lo cual genera confusión y por ello en el presente artículo se aclara cuál es la función y utilidad de cada uno.

Existen dos tipos de indicadores, internos y externos, los indicadores internos son compuestos

propios del alimento que tienen un buen índice de recuperación en las heces, como por ejemplo la fibra ácida insoluble, o la lignina (Fahey & Jung, 1983; Murray *et al.*, 1999; Kavanagh *et al.*, 2001); dentro de los indicadores externos se encuentran el óxido de cromo, el dióxido de titanio, entre otros, que son sustancias que no hacen parte del alimento y que se deben adicionar a la dieta en cantidades conocidas ya sea directamente en la ración, en cápsulas o en soluciones. Se adicionan a las dietas a concentraciones que varían de 1 a 5 g por kg de alimento (Kavanagh *et al.*, 2001; Carciofi *et al.*, 2007).

Para determinar la digestibilidad de los nutrientes usando indicadores, se debe conocer con precisión la cantidad de este que se adiciona en el alimento, y la cantidad que contienen las heces después del proceso digestivo, también se requiere conocer la composición nutricional del alimento y las heces; partiendo de estos valores se efectúan relaciones entre estas concentraciones para determinar los coeficientes de digestibilidad del nutriente deseado (Htoo *et al.*, 2007; Buñay, 2010).

Para calcular el contenido de óxido de cromo, las muestras de heces y de alimento se deben incinerar a 600°C durante una hora y media, seguido de digestión con una solución de ácido fosfórico con sulfato de manganeso y bromato de potasio, mientras que para el dióxido de titanio se incineran a 580°C durante trece horas, para después someterlas a digestión con ácido sulfúrico (Kavanagh *et al.*, 2001). Existen varios métodos que son utilizados para determinar la concentración del indicador, entre los que se encuentran la espectrometría de absorción visible, espectrofotometría de absorción de flama atómica (Carciofi *et al.*, 2007; Eklund *et al.*, 2012), la digestión en ácido nítrico y ácido perclórico (Bremer *et al.*, 2005). Si se usan métodos de colorimetría se debe tener en cuenta que los resultados pueden modificarse debido a la presencia de componentes de color en las muestras de heces (Carciofi *et al.*, 2007).

Empleo de la técnica y análisis de laboratorio

Se procede a calcular los requerimientos nutricionales de los animales, se formulan las dietas con las materias primas que se van a evaluar y se mezclan con el indicador. Los perros se sitúan en jaulas metabólicas equipadas con un mecanismo especial para separar las heces de la orina, se inicia con un periodo de adaptación a la dieta de mínimo cinco días, y uno experimental de tres a cinco días para la recolección de las

muestras fecales. El alimento se ofrece dos veces al día y se recolectan muestras de heces con la misma frecuencia, se pesan y se mantienen en congelación a -15°C hasta el momento en el que se vayan a realizar los análisis respectivos. Los coeficientes de digestibilidad aparente se determinan para cada alimento evaluado al calcular los contenidos del indicador en las heces. Se debe determinar la tasa de recuperación del indicador con la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación fecal del indicador} = \frac{\text{Indicador excretado en heces}}{\text{Indicador consumido}}$$

Al final del periodo de recolección, las heces se descongelan, se homogenizan y se mezclan en una sola muestra por animal (Carciofi *et al.*, 2007); posteriormente se continúa con los análisis descritos para el método de recolección total de heces.

Los coeficientes de digestibilidad aparente de los nutrientes, son entonces calculados a partir de las concentraciones del indicador usando la siguiente ecuación, nótese que no es necesario conocer la cantidad de alimento consumido ni la cantidad de heces:

$$\text{CDA} = \left\{ 1 - \frac{\text{NE} \times \text{IA}}{\text{NC} \times \text{IH}} \right\} \times 100$$

CDA: Coeficiente de digestibilidad aparente.

NC: Concentración del nutriente consumido.

NE: Concentración nutriente excretado. IA: Concentración del indicador en el alimento. IH: Concentración del indicador en las heces.

Al usar el método de los indicadores, no se requiere recolectar la totalidad de las heces, con una muestra de 100 g es suficiente para calcular el contenido del indicador y realizar los demás análisis bromatológicos de estas, lo que facilita en gran medida la realización de los experimentos. Los indicadores por lo general se pueden recuperar hasta en un 98%, lo que garantiza la

precisión de los resultados obtenidos (Kavanagh *et al.*, 2001; Harmon, 2007).

Método de Canulación Ileal

Para determinar la digestibilidad de los nutrientes en diferentes áreas del tracto gastrointestinal, se han desarrollado métodos para acceder a la digesta en varios puntos específicos de este, ejemplo de ello es la ubicación de cánulas en el íleon terminal (Walker *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1999; Dikeman *et al.*, 2007); en esta técnica, se adaptan cánulas T a los caninos a cinco o diez centímetros aproximadamente de la unión entre el ciego y el íleon (Walker *et al.*, 1994; Strickling *et al.*, 2000; Mosenthin *et al.*, 2007), a través de estas se puede recolectar parcial o totalmente el contenido digestivo, de esta manera se determina la digestibilidad del alimento a nivel del intestino delgado (Murray *et al.*, 1999), y se evita la posterior fermentación que se da en el intestino grueso, se constituye así en un método muy útil para determinar en qué sitio específico del tubo digestivo son disponibles y absorbidos los nutrientes, además de que las cánulas son fáciles de implantar en los animales y tienen muy poco efecto en el pasaje de la ingesta o en la digestibilidad de los nutrientes (Hill *et al.*, 1996).

En este método se pueden utilizar dos opciones, una es recolectar completamente la digesta ya

sea con el uso de marcadores para indicar el inicio y fin de la colecta o ayunando el animal, muy similar a lo que se realiza en el método de recolección total de heces; la otra opción es el uso de indicadores, en el cual solo es necesario tomar muestras de digesta como se realiza en el método de los indicadores (Murray *et al.*, 1999; Strickling *et al.*, 2000; Middelbos *et al.*, 2007). Los tiempos de adaptación y de recolección son los mismos que para los otros métodos descritos.

Durante el experimento, se adaptan collares isabelinos a los caninos para evitar accidentes con las cánulas o con la recolección de las muestras. La recolección de la digesta ileal se hace removiendo el tapón de la cánula y raspando la digesta acumulada en el cilindro de esta, para descartar el material acumulado y así asegurar la recolección de digesta fresca (Walker *et al.*, 1994; Dikeman *et al.*, 2007; Faber *et al.*, 2010). Se adaptan bolsas plásticas en las cánulas para que recolecten las muestras, siendo reemplazadas por bolsas nuevas cuando se encuentran llenas. Los perros se mantienen bajo observación constante para supervisar el proceso y el cambio de las bolsas cuando se requiere. Al final de cada recolección, al lado derecho de los animales, donde están implantadas las cánulas, se realiza limpieza y desinfección del área para remover la digesta que pueda irritar la piel o causar infecciones. Las muestras son pesadas y congeladas, cuando el periodo de recolección ha terminado se llevan al laboratorio para someterlas a los análisis proximales y en el caso de que se haya usado indicador, para cuantificarlo (Middelbos *et al.*, 2007; Mosenthin *et al.*, 2007; Dikeman *et al.*, 2007; Faber *et al.*, 2010; Eklund *et al.*, 2012).

Análisis de laboratorio

Los análisis de laboratorio, se realizan de la misma forma que se describió en el método de la recolección total de heces y en el método de los indicadores. Los coeficientes de digestibilidad aparente de los nutrientes se calculan mediante las proporciones del indicador y el nutriente, usando la siguiente ecuación, los valores se deben reemplazar en base seca:

$$CDA = \left\{ 1 - \frac{ND \times IA}{NC \times ID} \right\} \times 100$$

CDA: Coeficiente de digestibilidad aparente.

NC: Concentración del nutriente consumido.

ND: Concentración del nutriente en la digesta.

IA: Concentración del indicador en el alimento.

ID: Concentración del indicador en la digesta.

En los trabajos en los cuales no se use indicador se utiliza la fórmula del coeficiente de digestibilidad aparente del método de la recolección total de heces, solo que en este caso los valores de las heces son reemplazados por los valores de la digesta.

Una ventaja de este método es la facilidad de acceder a la digesta en diversos puntos del tracto gastrointestinal, lo que permite definir con mayor precisión en qué sitio del tubo digestivo se digieren los nutrientes y la disponibilidad de los mismos, hace una clara diferenciación entre la digestión que se da en el intestino delgado y el intestino grueso, lo cual proporciona un mejor entendimiento del proceso digestivo dentro del animal (Walker *et al.*, 1994; Harmon, 2007). Algunas desventajas son los costos que acarrear las implantaciones y la supervisión constante de los animales durante el periodo del experimento; en ocasiones los animales tienden a quitarse y a dañar las cánulas, o por mala implantación se desplazan, causando infecciones secundarias que pueden alterar los resultados y deteriorar la salud del animal (Hill *et al.*, 1996; Harmon, 2007).

Método de Predicción de Digestibilidad *In Vitro*

Existe una gran variedad de técnicas para predecir la digestibilidad a nivel de laboratorio, sin embargo solo se describirá uno de estos; esta metodología permite predecir la digestibilidad de las materias primas o de las dietas en el tubo digestivo de los animales al someter a los alimentos evaluados a una serie de pasajes por compuestos enzimáticos, que simulan la degradación que ocurre dentro del

organismo vivo teniendo en cuenta los segmentos del tracto gastrointestinal (Hervera *et al.*, 2007; Castrillo *et al.*, 2009; Coles *et al.*, 2011). Se preparan muestras entre 0,5 y 1 g del alimento a ser evaluado, deben estar finamente molidas, con partículas de un diámetro menor a 1 mm, se depositan en un matraz erlenmeyer de 50 ml, en cada serie de muestras se incluye un blanco (Hervera *et al.*, 2007; Lankhorst *et al.*, 2007; Coles *et al.*, 2011).

Primera etapa: simulación de la digestión gástrica

Se adicionan 25 ml de fosfato buffer (0,1 M, pH 6) a cada matraz que contiene la muestra, se mezcla mediante agitación magnética suave con el fin de facilitar la dilución de las proteínas (Hervera *et al.*, 2007); se adicionan 10 ml de ácido clorhídrico (HCL, 0,2 M), y se ajusta hasta un pH de 2 por medio de soluciones de ácido clorhídrico (1 M) y de hidróxido de sodio (NaOH, 1 M); posteriormente se adiciona 1 ml de solución de pepsina preparada recientemente, que contiene 10 mg de pepsina (3651 U/mg) y 1 ml de solución de cloranfenicol (0,5 g en 100 ml de etanol), con el fin de evitar crecimiento bacteriano durante la incubación; los matraces son cerrados con un tapón de caucho y las muestras se incuban en una cámara de temperatura controlada termostáticamente a 39°C durante dos horas con agitación magnética suave y constante (Boisen & Fernández, 1995; Hervera *et al.*, 2007).

Segunda etapa: simulación de la digestión post-gástrica

Después de la incubación, los matraces son enfriados a temperatura ambiente, se adicionan 10 ml de fosfato buffer (0,2 M, pH 6,8) y 5 ml de hidróxido de sodio (NaOH, 0,6 M); se ajusta el pH a 6,8 por medio de soluciones 1 M de ácido clorhídrico y 1 M de NaOH, se adiciona 1 ml de solución de pancreatina recientemente preparada que contiene 100 mg de pancreatina en polvo, se cierra el matraz y se incuba de nuevo a 39°C durante cuatro horas con agitación constante (Boisen & Fernández, 1995; Hervera *et al.*, 2007).

Filtración

Terminada la segunda etapa de incubación, los matraces se enfrían y se adicionan 5 ml de ácido sulfosalicílico al 20%; las proteínas solubilizadas, pero no digeridas, se dejan precipitar durante treinta minutos a temperatura ambiente. El residuo que queda de este proceso, se recolecta en una unidad filtradora usando crisoles de filtro de vidrio (3 cm de diámetro y poro No. 2) y se transfiere a un crisol con agua; después se realizan dos lavados consecutivos de tres minutos de duración cada uno con 10 ml de etanol al 96% y dos veces con 10 ml de acetona al 99% durante tres minutos, con el fin de remover la grasa de la fibra, por último al residuo indigerido se le determinan los nutrientes que se desean evaluar (Hervera *et al.*, 2007; Guevara *et al.*, 2008).

Los métodos *in vitro* son económicos y mucho más rápidos comparados con los métodos *in vivo*, se obtienen coeficientes de digestibilidad verdadera de las materias primas evaluadas, al no incluir los aportes endógenos propios del animal (Boisen & Eggum, 1991; Boisen & Fernández, 1995; Coles *et al.*, 2011), son muy prácticos cuando se requiere realizar una evaluación rápida de una materia prima; sin embargo es solo una aproximación a lo que realmente sucede en el animal, además de presentar variabilidad en los resultados según la metodología utilizada en cada laboratorio, lo cual dificulta establecer un modelo de predicción preciso (Harmon, 2007), y requiere de comparaciones con resultados obtenidos *in vivo*, para verificar la precisión de los resultados (Hervera *et al.*, 2007).

Conclusiones

El método de los indicadores se recomienda para determinar la digestibilidad de los alimentos utilizados en la nutrición canina por su practicidad, genera resultados que son un reflejo fiel de lo que sucede en el animal con tan solo la toma de algunas muestras, sin ser necesario la recolección total de las heces; los demás métodos como la canulación ileal se recomiendan en

investigaciones que quieran profundizar y especificar en qué parte del tracto digestivo son disponibles los nutrientes. Los métodos *in vitro* son de vital importancia cuando se desea determinar una aproximación a la calidad de las materias primas de manera rápida, como sucede en las fábricas de alimentos balanceados, en las cuales se debe analizar de forma rápida los ingredientes para aceptar o rechazar el ingreso de una determinada materia prima.

Referencias Bibliográficas

- Adesogan, A.T.; Owen, E.; Givens, D.I. Prediction of the *in vivo* digestibility of whole crop wheat from *in vitro* digestibility, chemical composition, *in situ* rumen degradability, *in vitro* gas production and near infrared reflectance spectroscopy. **Animal feed science and technology**, v.74, n.3, p.259-272, 1998.
- Association of American Feed Control Officials – AAFCO. **Official Publication**. Inc., Atlanta, GA, 1992.
- Bauer, E.; William, B.A.; Voigt, C. et al. Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. **Animal science**, v.73, p.313-322, 2001.
- Boisen, S.; Eggum, B.O. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. **Nutrition research reviews**, v.4, n.1, p.141-162, 1991.
- Boisen, S.; Fernández, J. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acid in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses. **Animal feed science and technology**, v.51, n.1, p.29-43, 1995.
- Bremer, H.; Fessel, C.A.; Pezzato, L.E. et al. Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. **Ciência rural**, v.35, n.3, p.691-697, 2005.
- Buñay, A.J.K. **Validación del método cenizas ácido insolubles para determinar digestibilidad en el alimento balanceado frente al método de recolección total**. Riobamba, Ecuador: Escuela superior politécnica del Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, 2010. 139p. Tesis (Bioquímico Farmacéutico).
- Burrows, C.F.; Kronfeld, D.S.; Banta, C.A. et al. Effects of fiber on digestibility and transit time in dogs. **The journal of nutrition**, v.112, n.9, p.1726-1732, 1982.
- Calabro, S.; Carone, F.; Cutrignelli, M.I. et al. The effect of haymaking on the neutral detergent soluble fraction of two intercropped forages cut at different growth stages. **Italian journal of animal sciences**, v.5, n.4, p.327-339, 2006.
- Carciofi, A.C.; de-Oliveira, L.D.; Valério, A.G. et al. Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.151, n.3, p.251-260, 2009.
- Carciofi, A.C.; Vasconcelos, R.S.; de-Oliveira, L.D. et al. Chromic oxide as a digestibility marker for dogs - A comparison of methods of analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v.134, n.3, p.273-282, 2007.
- Castrillo, C.; Hervera, M.; Baucells, M.D. Methods for predicting the energy value of pet foods. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, supl., p.1-14, 2009.
- Cavalari, A.P.; Lopes, D.J.; Viana, J.A. et al. Determinação do valor nutritivo de alimentos energéticos e proteicos utilizados em rações para cães adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1985-1991, 2006.
- Coles, L.T.; Moughan, P.J.; Awati, A. et al. Influence of assay conditions on the *in vitro* hindgut digestibility of dry matter. **Food chemistry**, v.125, n.4, p.1351-1358, 2011.
- Correa, G.V.; de-Oliveira, F.M.; Charleaux, N. et al. Zeólitas e *Yucca schidigera* em rações para cães: palatabilidade, digestibilidade e redução de odores fecais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.39, n.11, p.2442-2446, 2010.
- De Brito, C.B.M.; Felix, A.P.; de Jesus, R.M. et al. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal feed science and technology**, v.159, n.3, p.150-155, 2010.
- Diez, M.; Hornick, J.L.; Baldwin, P. et al. The influence of sugar-beet fiber, guar gum and inulin on nutrient digestibility, water consumption and plasma metabolites in healthy Beagle dogs. **Research in veterinary science**, v.64, n.2, p.91-96, 1998.
- Dikeman, C.L.; Barry, K.A.; Murphy, R.M. et al. Diet and measurement techniques affect

- small intestinal digesta viscosity among dogs. **Nutrition research**, v.27, n.1, p.56-65, 2007.
- Dobenecker, B.; Frank, V.; Kienzle, E. High calcium intake differentially inhibits nutrient and energy digestibility in two different breeds of growing dogs. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.94, n.5, p.109-114, 2010.
- Eklund, M.; Caine, W.R.; Sauer, W.C. et al. True and standardized ileal digestibilities and specific ileal endogenous recoveries of crude protein and amino acid in soybean meal, rapeseed meal and peas fed to growing pigs. **Livestock science**, v.145, n.1, p.174-182, 2012.
- Faber, T.A.; Bechtel, P.J.; Hernot, D.C. et al. Protein digestibility evaluations of meat and fish substrates using laboratory, avian, and ileally cannulated dog assays. **Journal of animal science**, v.88, n.4, p.1421-1432, 2010.
- Fahey, G.Jr.; Jung, H. Lignin as a marker in digestion studies: a review. **Journal of animal science**, v.57, n.1, p.220-225, 1983.
- Fortes, C.M.L.S.; Carciofi, A.C.; Sakomura, N.K. et al. Digestibility and metabolizable energy of some carbohydrate sources for dogs. **Animal Feed Science and Technology**, v.156, n.3, p.121-125, 2010.
- Gröner, T.; Pfeffer, E. Digestibility of organic matter and digestible energy in single ingredients of extruded dog feeds and their effects on faecal dry matter concentration and consistency. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.77, n.1.5, p.214-220, 1977.
- Guevara, M.A.; Bauer, L.L.; Abbas, C.A. et al. Chemical Composition, *in Vitro* Fermentation Characteristics, and *in Vivo* Digestibility Responses by Dogs to Select Corn Fibers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, n.5, p.1619-1626, 2008.
- Gutiérrez, K.L. **Potencial de la planta acuática *Lemna gibba* en la alimentación de cerdos**. Tecomán, México: Universidad de Colima, 2000. 70p. Tesis (Maestría en Ciencias Pecuarias).
- Ham, R.; Vermaut, S.; Flo, G. et al. Digestive performance of dogs fed a jojoba meal supplemented diet. **Industrial crops and products**, v.12, p.159-163, 2000.
- Harmon, D. Experimental approaches to study the nutritional value of foods ingredients for dogs and cats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, Suplemento especial, p.251-262, 2007.
- Hervera, M.; Baucells, M.D.; Blanch, F. et al. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by *in vitro* analyses. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.91, n.5-6, p.205-209, 2007.
- Hilcko, K.P.; Felix, A.P.; de-Oliveira, S.G. et al. Diferentes graus de moagem em dietas para cães. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2511-2515, 2009.
- Hill, R.C.; Burrows, C.F.; Ellison, G.W. et al. The use of chromic oxide as a marker for measuring small intestinal digestibility in cannulated dogs. **Journal of animal science**, v.74, n.7, p.1629-1634, 1996.
- Htoo, J.K.; Araiza, B.A.; Sauer, W.C. et al. Effect of dietary protein content on ileal amino acid digestibility, growth performance, and formation of microbial metabolites in ileal and cecal digesta of early-weaned pigs. **Journal of animal science**, v.85, p.3303-3312, 2007.
- Jagger, S.; Wiseman, J.; Cole, D.J.A. et al. Evaluation of inert markers for the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. **British journal of nutrition**, v.68, n.3, p.729-739, 1992.
- Julliand, V.; De Fombelle, A.; Varloud, M. Starch digestion in horses: The impact of feed processing. **Livestock science**, v.100, n.1, p.44-52, 2006.
- Kavanagh, S.; Lynch, P.B.; O'mara, F. et al. A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. **Animal feed science and technology**, v.89, n.1, p.49-58, 2001.
- Kienzle, E.; Schrag, I.; Butterwick, R. et al. Calculation of gross energy in pet foods: new data on heat combustion and fibre analysis in a selection of foods for dogs and cats. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.85, n.5-6, p.148-157, 2001.
- Krogdahl, A.; Ahlstrom, O.; Skrede, A. Nutrient Digestibility of Commercial Dog Foods Using Mink as a Model. **The journal of nutrition**, v.134, n.8, p.2141-2144, 2004.
- Lankhorst, C.; Tran, Q.D.; Havenaar, R. et al. The effect of extrusion on the nutritional value of canine diets as assessed by *in vitro* indicators. **Animal feed science and technology**, v.138, n.3-4, p.285-297, 2007.
- Maynard, L. **Nutrición Animal**. 7.ed. México: McGraw-Hill, 1986. p.

- Middelbos, I.S.; Fastinger, N.D.; Fahey G.C. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. **Journal of animal science**, v.85, n.11, p.3033-3044, 2007.
- Mosenthin, R.; Jansman, A.J.M.; Eklund, M. Standardization of methods for the determination of ileal amino acid digestibilities in growing pigs. **Livestock science**, v.109, p.276-281, 2007.
- Murray, S.M.; Patil, R.M.; Fahey, G.C. et al. Apparent digestibility and glycaemic responses to an experimental induced viscosity dietary fibre incorporated into an enteral formula fed to dogs cannulated in the ileum. **Food and chemical toxicology**, v.37, n.1, p.47-56, 1999.
- National Research Council - NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. Washington, DC: National Academy Press, 2006. 424p.
- Nery, J.; Biourge, V.; Tournier, C. et al. Influence of dietary protein content and source on fecal quality, electrolyte concentrations, and osmolarity, and digestibility in dogs differing in body size. **Journal of animal science**, v.88, n.1, p.159-169, 2010.
- Nieves, D.; Barajas, A.; Delgado, G. et al. Digestibilidad fecal de nutrientes en dietas con forrajes tropicales en conejos: Comparación entre métodos directo e indirecto. **Bioagro**, v.20, n.1, p.73-75, 2008.
- Rodríguez, N.; Simões, E.O.; Guimarães-Junior, R. et al. Uso de indicadores para estimar consumo y digestibilidad de pasto. Lipe, lignina purificada y enriquecida. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.20, n.4, 2007.
- Secombe, C.J.; Lester, G.D. The role of diet in the prevention and management of several equine diseases. **Animal feed science and technology**, v.173, n.1-2, p.86-101, 2012.
- Silvio, J.; Harmon, D.L.; Gross, K.L. et al. Influence of fiber fermentability on nutrient digestion in the dog. **Basic nutritional investigation**, v.16, n.4, p.289-295, 2000.
- Stein, H.H.; Fuller, M.F.; Moughan, P.J. et al. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. **Livestock science**, v.109, p.282-285, 2007.
- Strickling, J.A.; Harmon, D.L.; Dawson, K.A. et al. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal feed science and technology**, v.86, n.3, p.205-219, 2000.
- Tavares, G.C.M.B.; Araújo, A.H.B.; Colnago, G.L. et al. Composição química e digestibilidade de partes e subprodutos de aves nas formas crua e cozida para cães. **Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v.62, n.2, p.453-459, 2010.
- Twomey, L.N.; Pluske, J.R.; Rowe, J.B. et al. The effects of added fructooligosaccharide (raftilosa®P95) and inulinase in the faecal quality and digestibility in dogs. **Animal feed science and technology**, v.108, n.1-4, p.83-93, 2003.
- Walker, J.A.; Harmon, D.L.; Gross, K.L. et al. Evaluation of nutrient utilization in the canine using the ileal cannulation technique. **The journal of nutrition**, v.124, p.2672S-2676S, 1994.
- Weber, M.; Bissot, T.; Servet, E. et al. High-protein, High-fiber diet designed for weight loss improves satiety in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v.21, n.6, p.1203-1208, 2007.
- Zanatta, C.P.; Félix, A.P.; Brito, C.B.M. et al. Digestibility of dry extruded food in adults dogs and puppies. **Arquivo Brasileiro de medicina veterinaria y zootecnia**, v.63, n.3, p.784-787, 2011.
- Zentek, J.; Fricke, S.; Hewicker-Trautwein, M. et al. Dietary Protein Source and Manufacturing Processes Affect Macronutrient Digestibility, Fecal Consistency, and Presence of Fecal *Clostridium perfringens* in Adult Dogs. **The journal of nutrition**, v.134, n.8, p.2158-2161, 2004.