

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS TRIPSINA Y LIPASA PANCREÁTICAS EN CERDOS ALIMENTADOS CON HARINA DE PIJIGUAO (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Y LISINA SINTÉTICA

*Trypsin and Lipase Pancreatic Enzymes Activity in Pigs Fed with Pijiguo Meal (*Bactris gasipaes* H.B.K.) and Synthetic Lysine*

Milagro V. León^{*1}, Janeth J. Colina^{**}, Daniel Rico^{***}, Humberto Araque^{***}, Mario Rossini^{****},
María V. Castañeda^{*} y Emma E. Rueda de Arvelo^{*}

^{*}Cátedra de Bioquímica, ^{**}Cátedra de Producción Animal ^{***}Cátedra de Patología, Facultad de Ciencias Veterinarias, ^{****}Instituto de Producción Animal Facultad de Agronomía,
Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563, Maracay 2101. Estado Aragua, Venezuela

Correo-E: milagro.leon@ucv.ve

Recibido: 04/10/13 - Aprobado: 03/07/14

RESUMEN

Para determinar la actividad de las enzimas tripsina y lipasa pancreática de cerdos alimentados con harina de pijiguo (*Bactris gasipaes* H.B.K., HP) y lisina sintética (LS), se diseñó un experimento con 48 cerdos castrados, con peso vivo promedio de $30 \pm 0,5$ kg, distribuidos al azar en seis diferentes dietas experimentales, con un arreglo factorial 3×2 , con tres niveles de HP (0, 16 y 32 %), con o sin adición de 0,27% de LS; con cuatro repeticiones por dieta y dos cerdos por unidad experimental. Se sacrificaron cuatro cerdos por dieta en la tercera y sexta semana, para obtener muestras de páncreas. No se observó efecto de dieta (HPxLS) sobre la actividad de las enzimas, pero si hubo efecto ($P < 0,05$) de la interacción dieta x semana sobre la actividad de la tripsina y lipasa. No hubo diferencias significativas en la actividad de la tripsina en la tercera semana después del consumo de las dietas. En la sexta semana todas las dietas, excepto la que contenía 0,27% LS y 16% HP, mostraron menor ($P < 0,05$) actividad de la tripsina que la dieta basal. La actividad de la lipasa pancreática fue mayor ($P < 0,05$) en los cerdos que consumieron la dieta con 32% HP sin LS en la tercera semana; y en la sexta semana, la actividad fue menor ($P < 0,05$) en los cerdos cuyas dietas contenían 16% HP con y sin la adición de

ABSTRACT

An experiment was conducted to determine the activities of trypsin and lipase pancreatic enzymes from growing pigs fed peach palm meal (*Bactris gasipaes* H.B.K.; PPM) and synthetic lysine (SL). Forty-eight barrows, with an average live weight of 30 ± 0.5 kg, were randomly distributed and allotted to six experimental diets in a 3×2 factorial arrangement of treatments, with three levels of PPM (0, 16 and 32 %), with or without the addition of 0.27% SL, with four replications per diet and two pigs per experimental unit. To collect pancreas samples, four pigs per diet were slaughtered at third and sixth weeks. The results of the assay showed no effect of diet (PPM xLS) on the activity of the enzymes. An effect ($P < 0.05$) of the diet x week interaction on trypsin and lipase enzymatic activities was observed. There were no significant differences in the activity of trypsin in the third week, after consumption of diets. In the sixth week, all diets, except that containing 0.27 % of SL and 16 % of PPM, showed lower ($P < 0.05$) trypsin activity than the basal diet. In the third week, the pancreatic lipase activity was greatest ($P < 0.05$) in pigs fed the diet with 16% of PPM without SL; and in the sixth week, the activity was less ($P < 0.05$) in pigs fed diets containing 32% of PPM with and without the addition of

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

0,27% LS, en comparación con la dieta basal y la que contenía 32% HP sin LS. En conclusión, la HP y/o LS en dietas para cerdos en crecimiento afecta la actividad de las enzimas tripsina y lipasa pancreáticas luego de la sexta semana de consumo.

0.27% of SL, when compared with the basal diet and that which contained 32% of PPM and/or SL. In summary, the PPM and/or SL diets affect the trypsin and pancreatic lipase activities after sixth weeks of consumption.

(Palabras clave: Lipasa pancreática; tripsina; *Bactris gasipaes* (pijiguo); lisina; cerdos en crecimiento)

(Key words: Pancreatic lipase; trypsin; *Bactris gasipaes* (pijiguo); lysine; growing pigs)

INTRODUCCIÓN

El fruto de la palma tropical *Bactris gasipaes* H.B.K. (pijiguo), nativa de América del Sur [1], ha sido considerado una alternativa en la alimentación animal para sustituir parte de las materias primas de costo elevado que compiten con la alimentación humana, como el maíz y la soya. Se ha demostrado que la harina del fruto de pijiguo (HP) contiene actividad lipolítica endógena [2]; no obstante su inclusión de hasta 32% en la dieta no compromete el desempeño productivo de cerdos en crecimiento [3]. Por otra parte, se ha determinado que la adición de hasta un 40% de harina del epicarpio del fruto en la dieta de cerdos no disminuye la digestibilidad de la materia seca, la materia orgánica y la energía, aunque sí disminuye la digestibilidad de la proteína cuando la inclusión es superior al 10% [4].

La digestibilidad de un nutriente está asociada a la actividad de las enzimas digestivas [5]. Después del destete de los cerdos, la actividad de las enzimas pancreáticas disminuye, restableciéndose entre los 7-9 d posteriores [6]. La actividad de la tripsina en el jugo pancreático aumenta con la edad. Se han reportado valores desde 14,6 μ moles de sustrato hidrolizado/min al tercer día de edad, hasta 549 μ moles de sustrato hidrolizado/min/g de páncreas a las seis semanas de edad [5,7]. La actividad de la lipasa también aumenta con la edad debido a la alometría positiva del páncreas [7].

Por otro lado, se ha demostrado que la cantidad adecuada de lisina en la dieta tiene un efecto significativo sobre la ganancia de peso y la conversión alimenticia, sin influir en el consumo diario de la

ración o en el consumo de energía metabolizable [8]. La eficiencia de utilización de la lisina en diferentes fuentes proteicas varía ampliamente y depende principalmente de la deposición diaria de proteína corporal [9]. La HP tiene un bajo contenido de lisina y otros aminoácidos esenciales, por lo que la adición de aminoácidos sintéticos para cubrir los requerimientos, cuando se incluye este ingrediente en las dietas para cerdos, podría constituir una alternativa de interés [10].

Las variaciones en el perfil de nutrientes de las materias primas que conforman la dieta pueden afectar las actividades enzimáticas y, por ende, su digestibilidad. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad de las enzimas tripsina y lipasa pancreática de cerdos en crecimiento alimentados con HP con o sin adición de lisina sintética (LS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de los Cerdos

Los cerdos fueron alojados en las instalaciones de la Sección Laboratorio de Porcinos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV) en Maracay, estado Aragua. Se utilizaron 48 cerdos castrados cruzados (1/2 Yorkshire \times 1/4 Landrace \times 1/4 Duroc), adquiridos en una granja comercial; los animales fueron desparasitados con ivermectina (30 d) y vacunados contra peste porcina clásica (70 d), micoplasma (28 y 42 d), pseudorabia (49 d), y fiebre aftosa (56 d). El peso vivo promedio de los cerdos al inicio y en la sexta semana fue 30,00 \pm 0,5 kg y 64,02 \pm 1,90 kg, respectivamente. Los cerdos se distribuyeron al azar en seis dietas

experimentales con cuatro réplicas en 24 corrales de 4 m² cada uno (dos cerdos por corral), provistos con un comedero y un bebedero tipo chupón, de acero inoxidable, para el suministro durante seis semanas de alimento y agua *ad libitum*.

Dietas Experimentales

La HP fue obtenida a partir de frutos colectados en el estado Amazonas, Venezuela; troceados y secados en estufa a 65 °C durante 72 h. La HP se añadió a las dietas experimentales en proporciones de 16 y 32%, sustituyendo el 25 y 50%, respectivamente, de la energía digestible aportada por el maíz a la dieta basal. La dieta basal y las dietas con 16 y 32% HP con o sin la adición de 0,27% de LS, representaron las seis dietas experimentales, cuya composición ha sido descrita previamente [3, 11]. Se realizaron análisis químicos para determinar la composición de la HP, solubilidad de la proteína con pepsina y KOH, la presencia de inhibidores de tripsina, cuya metodología y resultados de estos análisis ya fueron publicados [11].

Preparación del Homogenado Pancreático

En la tercera y sexta semanas del experimento, se sacrificaron cuatro cerdos por dieta, con pesos promedio de 47,16 y 64,02 kg respectivamente, en ambos casos para tomar las muestras de páncreas y obtener el homogenado pancreático. Después de 24 h de ayuno, los cerdos se trasladaron a la sala de matanza de la Sección Laboratorio de Porcinos de la Facultad de Agronomía de la UCV y fueron beneficiados siguiendo procedimientos tradicionales (aturdimiento, sangrado y eviscerado). Inmediatamente, a cada cerdo se le removió el páncreas el cual fue sumergido en solución salina fisiológica de 0 a 4 °C, para trasladarlo al Laboratorio de Enzimología y Toxicología, adscrito a la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, para su procesamiento. Los páncreas fueron pesados y luego homogeneizados utilizando un homogenizador de tejidos (OMNI TH), a máxima velocidad, durante 3 min, a intervalos de 1 min con 30 s de reposo, en 4 mL/g de solución salina fisiológica, centrifugados a 15000 g por 30 min, almacenándose el sobrenadante en alícuotas a -80 °C hasta que fueron requeridos para las determinaciones enzimáticas.

Actividad Enzimática

Se realizó la estandarización para estimar el tiempo adecuado de incubación en el cual la actividad

enzimática se correspondiese con la velocidad inicial de la reacción en un rango lineal. Así mismo, se estandarizó la cantidad de proteína en el homogenado para realizar las mediciones de actividad. Todos los análisis enzimáticos se realizaron por triplicado.

Tripsina

La actividad de la tripsina se determinó en el homogenado de páncreas utilizando la técnica descrita en la literatura [12]. El homogenado (0,3 mg de proteína) fue incubado durante 15 min a 41 °C con 200 µL del sustrato caseína al 1% en tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7,4. La reacción se detuvo con la adición de 1 mL de ácido tricloroacético al 5% p/v y la mezcla fue filtrada en papel Whatman 42. Se hicieron reaccionar 250 µL del filtrado con 1250 µL de Na₂CO₃ 200 mM y 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:5 en agua destilada. Después de la incubación durante 20 min a 41 °C, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm. Los valores de absorbancia fueron comparados con los de una curva estándar elaborada a partir de una solución de tirosina (1 mg/mL). La actividad de la tripsina se expresó como µg de tirosina liberada/min/mg de proteína.

Lipasa Pancreática

La actividad de la lipasa se determinó en homogenado de páncreas utilizando el método de Tietz y Fiereck [13]. Se determinó el volumen de NaOH 50 mM necesario para neutralizar los ácidos grasos liberados durante 5 min de incubación, con agitación moderada a 37 °C, con 3 mL de aceite de oliva utilizado como sustrato, y 3 mg de proteína de homogenado pancreático. La actividad de la enzima se expresó como µL de NaOH/min/mg de proteína.

Análisis de Proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford [14], utilizando el tampón correspondiente como blanco y albúmina sérica bovina como estándar.

Diseño del Experimento

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos, con tres niveles de HP (0, 16 y 32%) y dos niveles de LS (0 y 0,27%), para

un total de seis tratamientos. La unidad experimental estuvo constituida por dos cerdos, con cuatro unidades experimentales por tratamiento. El análisis de los datos se realizó a través del procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico SAS (15), utilizando un modelo estadístico que incluyó los efectos principales de HP, LS, semana de medición (medidas repetidas en el tiempo) y las interacciones correspondientes. Se realizaron comparaciones utilizando la prueba de *t* de Student para comparar las medias de los diferentes tratamientos.

Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + LS_i + HP_j + LS_i * HP_j + E1_{ijk} + S_k + LS_i * HP_j * S_k + E2_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Actividad enzimática de la *i*-ésima réplica en el *i*-ésimo nivel de lisina (LS), *j*-ésimo nivel de HP en la *k*-ésima semana.

μ = Media teórica de la población

LS_i = Efecto de LS (*i* = 0 y 0,27%)

HP_j = Efecto de HP (*j* = 0, 16 y 32 %)

$LS_i * HP_j$ = Efecto de la interacción LS × HP (efecto de dieta)

$E1_{ijk}$ = Error experimental debido a las medidas repetidas normalmente distribuido con media 0 y varianza σ^2

S_k = Efecto de la semana (*k* = 3 y 6)

$LS_i * HP_j * S_k$ = Efecto de la interacción entre LS × HP × S (dieta × semana)

$E2_{ijkl}$ = Residual, normal e independientemente distribuido con media 0 y varianza σ^2

Los valores para cada variable se expresaron como valores promedios con el respectivo error estándar. En los casos en que los efectos de la interacción fueron significativos, no se discutieron los efectos principales de los factores evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observó efecto de la interacción HP×LS sobre la actividad de las enzimas tripsina y lipasa pancreática. Se observó efecto significativo de la inclusión de HP ($P < 0,001$) o LS ($P < 0,05$) a la dieta, como se evidencia en la Figura 1 (a y b, respectivamente) sobre la actividad de la lipasa; no obstante, estos efectos no fueron independientes de las semanas evaluadas. En tal sentido, se destaca el efecto significativo de la interacción dieta × semana ($P < 0,05$) sobre la actividad de la tripsina (Cuadro

1) y lipasa (Cuadro 2). En los cerdos que recibieron la dieta basal, la actividad de la tripsina aumentó con la edad ($P < 0,05$), lo cual coincide con lo señalado en la literatura [5,7]. En los tratamientos en los cuales se incluyó HP, con o sin LS, si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se observó una marcada tendencia al incremento de la actividad con la edad, que fluctuó entre 6 y 99% en la sexta semana con respecto a la tercera semana. No hubo diferencias significativas en la actividad de la tripsina en la tercera semana de edad, es decir, la inclusión de HP con o sin LS no afectó esta variable bioquímica. No obstante, tres semanas después, se observó que la HP, con o sin adición de LS, disminuyó la actividad de la tripsina, con respecto a la dieta basal, a excepción del tratamiento que contenía 16% HP + 0,27% LS, dieta en la cual pudo haberse logrado una adecuada combinación de factores.

Se ha demostrado que el fruto del pijigauo presenta actividad inhibitoria de la tripsina, asociada a una proteína con un peso molecular cercano a 10.000 Da [16], localizada principalmente en la cáscara del fruto, que disminuye su potencia aproximadamente diez veces cuando se evalúa en el fruto integral [17]. De manera general, las proporciones de HP utilizadas en el presente trabajo provocaron inhibición de la actividad de la tripsina después de seis semanas continuas, pudiendo ser en parte, atribuida a la presencia de ciertos inhibidores de tripsina contenidos en la harina proveniente del fruto integral conjuntamente con los otros ingredientes de la dieta [18].

El Cuadro 2, muestra el efecto de la interacción dieta × semana sobre la actividad de la lipasa pancreática. La mayoría de las dietas no variaron significativamente la actividad de la lipasa pancreática en la sexta semana con respecto a la tercera semana, a excepción de la dieta basal, la cual produjo mayor ($P < 0,05$) actividad de esta enzima, tal como ocurrió con la tripsina. La inclusión de 32% de HP aumentó la actividad de la lipasa pancreática de forma significativa ($P < 0,05$) en la tercera semana de tratamiento. No obstante, en la sexta semana se observó disminución significativa de la actividad de esta enzima al incluir 16% de HP, con y sin 0,27% LS, con respecto a la dieta basal. No se observó el aumento característico de la actividad de la lipasa con la edad de los animales, en aquellos tratamientos que recibieron HP en cualquiera de las proporciones

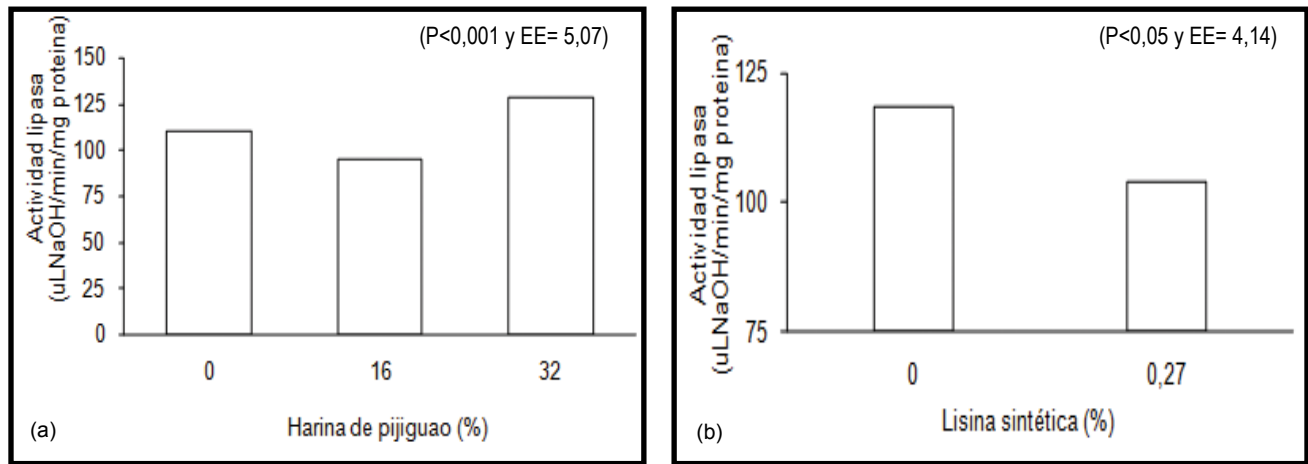


Figura 1. Efectos de la harina de pijiguao (a) y lisina sintética (b) sobre la actividad de la lipasa pancreática de cerdos en crecimiento. EE = Error estándar

Cuadro 1. Efecto de la interacción dieta × semana sobre la actividad de la enzima tripsina pancreática en cerdos en crecimiento

LS (%) ¹	Actividad tripsina (μg Tir/min/mg proteína)					
	0			0,27		
HP (%) ²	0	16	32	0	16	32
3 ^{ra} Semana	2089 ^b	3760 ^b	4714 ^b	2706 ^b	3212 ^b	2579 ^b
6 ^{ta} Semana	9884 ^a	6116 ^b	5004 ^b	5401 ^b	13100 ^a	3672 ^b

¹LS= Lisina sintética

²HP= Harina de pijiguao

^{ab} Letras diferentes en la misma fila y en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05); error estándar = 1647,80

Cuadro 2. Efecto de la interacción dieta × semana sobre la actividad de la enzima lipasa pancreática en cerdos en crecimiento

¹ LS (%)	Actividad lipasa (μL NaOH/min/mg proteína)					
	0			0,27		
² HP (%)	0	16	32	0	16	32
3 ^{ra} Semana	93 ^b	107 ^b	150 ^a	87 ^b	85 ^b	115 ^b
6 ^{ta} Semana	147 ^a	82 ^b	132 ^a	113 ^{ab}	104 ^b	120 ^{ab}

¹LS= Lisina sintética

²HP= Harina de pijiguao

^{ab} Letras diferentes en la misma fila y en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05); error estándar = 11,40

y combinaciones con LS evaluadas, lo que pudo ser evidenciado al no encontrarse diferencias significativas entre la tercera y sexta semanas en todos los tratamientos que incluían HP con o sin LS. Por el contrario, en los cerdos que recibieron la dieta basal, se observó aumento de la actividad con la edad de los animales, tal como ha sido señalado por otros autores [5,7].

La mayor actividad específica de la lipasa observada en la tercera semana para los cerdos que consumieron la dieta con 32% HP sin LS, probablemente está asociada con el contenido de grasa en la dieta, aunque esta respuesta no se mantuvo, pues en la sexta semana esta dieta no fue diferente de la basal. Se sabe que el tipo, el origen y el nivel de grasa en la dieta son factores importantes que afectan la secreción de enzimas lipolíticas pancreáticas [19], por ejemplo, en cerdos en crecimiento que recibieron aceite de pescado, se observó una mayor secreción de lipasa pancreática

en comparación con los que recibieron otra fuente de grasa como aceite de coco o manteca de cerdo, aunque no se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad de nutrientes y energía entre los grupos [20]. En el presente estudio, la composición lipídica de la HP caracterizada por 138,90 g/kg de grasa cruda, conjuntamente con el alto contenido de los ácidos palmítico y oleico [21], pudo haber sido el factor que provocó el aumento en la actividad lipasa, en los cerdos que consumieron 32% de HP sin LS en la dieta. Estos resultados pueden explicar, en parte, el aumento de la concentración de ácido palmítico en el perfil de lípidos sanguíneos de cerdos en crecimiento, previamente observado [21].

Otros factores nutricionales también pueden modificar la actividad de la lipasa pancreática [22], por lo cual, estos resultados pueden atribuirse, en parte, a la ausencia en la HP, de procianidinas, una clase de flavonoides poliméricos de alto peso molecular que comprenden la catequina, la epicatequina, sus

oligómeros y sus formas esterificadas con glucosa y ácido gálico [23], a los cuales se les ha atribuido la acción de inhibir la actividad de la lipasa pancreática al ejercer una interacción específica con la enzima y suelen estar contenidos en frutos de colores intensos como la uva [24]. Por otra parte, en un tamizaje fitoquímico cualitativo realizado en la HP se descartó la presencia de fenoles, taninos condensados, proantocianidinas, flavonoides, taninos, los cuales precipitan proteínas, quinonas, esteroides, cumarinas y alcaloides [25]. Otros metabolitos no identificados presentes en extractos metanólicos y etanólicos de diversos frutos han mostrado un efecto inhibitorio de esta enzima [26, 27].

El efecto de 16% de HP, con y sin 0,27% LS en la dieta sobre la reducción de la actividad de la lipasa observado en la sexta semana, aunque sin valores diferentes a los de la tercera semana, podría estar influenciado por la composición y el nivel de los lípidos contenidos en la HP, ya que se ha señalado, que estos son factores determinantes de la secreción pancreática de la lipasa [2,19]. La respuesta de menor actividad de la lipasa en las dietas que contenían 16% HP, con o sin LS, indica que este aminoácido no produce ningún cambio sobre la misma cuando se añade en forma libre a una dieta con la proporción señalada de HP.

En el presente estudio se evidenció que un cambio en la composición de la dieta que involucre diferentes fuentes de lípidos y composición de los ácidos grasos aportados, puede provocar cambios en la actividad de la enzima lipasa y, a más largo plazo, sobre la tripsina, coincidiendo con lo señalado en la literatura [28]. Si bien es importante considerar que las secreciones pancreáticas responden a un estímulo alimentario, la actividad de estas enzimas, una vez que ingresan a la mucosa intestinal, también puede ser afectada, según estudio realizado en pollos de engorde [12]. Las actividades de las enzimas lipasa, tripsina y quimotripsina en el contenido del intestino delgado, están significativamente correlacionadas con las potencialidades de estas enzimas en el páncreas [29]. Los cambios observados como consecuencia de la composición de la dieta han sido también reportados por otros autores en cerdos de menor peso, alimentados con harina de soya en comparación con harina de soya fermentada con *Bacillus subtilis* (HSFBS). Al respecto, se observó que la actividad total de proteasas y tripsina en el duodeno y yeyuno fue mayor con

HSFBS, aunque la actividad de la tripsina en el páncreas disminuyó en estos cerdos [30].

CONCLUSIÓN

El consumo de HP, en proporciones de 16 y 32% durante tres semanas continuas, no afecta la actividad de las enzimas tripsina y lipasa pancreática, independientemente de la inclusión de 0,27% de LS. No obstante, el consumo continuo de HP durante seis semanas puede provocar disminución de la actividad de ambas enzimas. La dieta con 16% HP + 0,27% LS no provoca disminución de la tripsina aún después de la sexta semana de consumo.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) por el financiamiento concedido para la ejecución del Proyecto: PG No 11-7137-2008.

REFERENCIAS

1. Morton J Pejibaye. In: Fruits of Warm Climates. Julia F Morton, Miami, FL. 1987; p. 12-14.
2. Mora-Kopper S, Mora-Urpi J, Mata-Sagrada J. Lipolytic activity in meals of pejibaye palm fruit (*Bactris gasipaes*, Palmae). Rev Biol Trop. 1997; 44(3)/45(1):597-9.
3. Rico D, Colina J, Araque H, Rossini M, Rueda E, León M. Comportamiento productivo de cerdos en crecimiento alimentados con harina integral de pijiguo (*Bactris gasipaes* H.B.K) y lisina. Rev Fac Agron (UCV). 2009; 35(2): 49-55.
4. González C, Díaz I, Salas R. Determinación de la digestibilidad ileal aparente en cerdos de la harina de pijiguo (*Bactris gasipaes* H.B.K.). Arch Latinoam Prod Anim. 1997; 5(3):283-4.
5. Jensen MS, Jensen SK, Jakobsen K. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. J Anim Sci. 1997; 75(2):437-45.
6. Hedemann MS, Jensen BB. Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. Arch Anim Nutr. 2004;58(1):47-59.
7. Lindemann MD, Cornelius SG, El-Kandelgy SM, Moser RL, Pettigrew JE. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. J Anim Sci. 1986; 62(5):1298-307.
8. Hurtado-Nery VL, Nobre-Soares RT, Sant'Anna-Lyra

- M. Efecto de los niveles de lisina digestible sobre el rendimiento de cerdos en crecimiento de 45 a 70 kg de peso alimentados con raciones conteniendo subproductos de arroz. *Orinoquia*. 2012; 16(1):39-45.
9. Thong HT, Liebert F. Amino acid requirement of growing pigs depending on amino acid efficiency and level of protein deposition 1st communication: lysine. *Arch Anim Nutr*. 2004; 58(1):69-87.
 10. Leterme P, García M, Londoño A, Rojas M, Buldgen A, Souffrant W. Chemical composition and nutritive value of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in rats. *J. Sci Food Agric*. 2005; 85: 1505-12.
 11. Colina J, Rico D, Araque HE, Rueda E, León MV, Tovar CL, Rossini M. Hematología, metabolitos sanguíneos y peso de órganos de cerdos en crecimiento alimentados con harina de pijiguao (*Bactris gasipaes* H.B.K.) y Lisina. *Rev Fac Cs Vets*. 2010; 51(1):51-62.
 12. León M, Rueda E, Castañeda M, Méndez A, Michelangeli C. Efecto de la concaavalina A sobre la actividad de las enzimas α -amilasa y tripsina en pollos de engorde. *Rev Cientif FCV-LUZ*. 2007; 17(1): 83-8.
 13. Tietz NW, Fiereck EA. A specific method for serum lipase determination. *Clin Chem Acta*. 1966; 13(3):352-8.
 14. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
 15. Statistical Analysis System (SAS 9.1). SAS Institute Inc., SAS 9.1, Cary, NC: 2004. [acceso 12 de diciembre de 2009]. Disponible en: <http://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/index.html>.
 16. Murillo M, Kroneberg A, Mata J, Calzada J, Castro V. Estudio preliminar sobre factores inhibidores de enzimas proteolíticas en la harina de pejibaye (*Bactris gasipaes*). *Rev Biol Trop*. 1983; 31(2): 227-31.
 17. Gómez G, Quesada S, Nanne C. Efecto de factores antinutricionales en el pejibaye (*Bactris gasipaes*) sobre el metabolismo de ratas jóvenes. *Agron Costarricense*. 1998; 22(2):191-8.
 18. Chaparro SP, Aristizabal ID, Gil JH. Reducción de factores antinutricionales de la semilla de vitabosa (*Mucuna deeringiana*) mediante procesos fisicoquímicos. *Rev Fac Nal Agr. Medellín*. 2009; 62:5157-64.
 19. Jakob S, Mosenthin R, Sauer WC. The influence of lipids on exocrine pancreatic secretions in pigs. *Review. Asian-Aus J Anim Sci*. 2000; 13(5): 711-19.
 20. Hedemann MS, Pedersen AR, Engberg RM. Exocrine pancreatic secretion is stimulated in piglets fed fish oil compared with those fed coconut oil or lard. *J Nutr*. 2001; 131(12):3222-6.
 21. Colina J, Méndez A, Araque H, Rueda E, León M, Rossini M. Lípidos sanguíneos en cerdos alimentados con pijiguao (*Bactris gasipaes* Kunth) y lisina sintética. *Rev MVZ Córdoba*. 2011; 16(3): 2668-77.
 22. Hedemann MS, Jensen BB, Poulsen HD. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. *J Anim Sci*. 2006; 84(12):3310-20.
 23. Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds- biochemistry and functionality. *J Med Food*. 2003; 6(4):291-9.
 24. Gonçalves R, Mateus N, de Freitas V. Study of the interaction of pancreatic lipase with procyanidins by optical and enzymatic methods. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(22):11901-6.
 25. Pizzani P, Blanco M, Malaver T, Godoy S, Matute I, Palma J, Obispo NE. Composición fitoquímica y nutricional de harina de pijiguao (*Bactris gasipaes* Kunth en H.B.K.). *Zootecnia Trop*. 2008; 26(3): 235-8.
 26. Birari R, Roy SK, Singh A, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitory alkaloids of *Murraya koenigii* leaves. *Nat Prod Commun*. 2009; 4(8):1089-92.
 27. Morikawa T, Xie Y, Asao Y, Okamoto M, Yamashita C, Muraoka O, Matsuda H, Pongpiriyadacha Y, Yuan D, Yoshikawa M. Oleanane-type triterpene oligoglycosides with pancreatic lipase inhibitory activity from the pericarps of *Sapindus rarak*. *Phytochem*. 2009; 70(9):1166-72.
 28. Porsgaard T, Xu X, Götsche J, Mu H. Differences in the intramolecular structure of structured oils do not affect pancreatic lipase activity in vitro or the adsorption by rats of (n-3) fatty acids. *J Nutr*. 2005; 135(7):1705-11.
 29. Debray L, Le Huerou-Luron I, Gidenne T, Fortun-Lamothe L. Digestive tract development in rabbit according to the dietary energetic source: correlation between whole tract digestion, pancreatic and intestinal enzymatic activities. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003; 135(3):443-55.
 30. Feng J, Liu X, Xu ZR, Lu YP, Lui YY. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. *Dig Dis Sci*. 2007; 52(8):1845-50.