



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DEL ÓXIDO DE CROMO (Cr_2O_3) Y DEL DIÓXIDO DE
TITANIO (TiO_2) COMO MARCADORES DE LA DIGESTIBILIDAD
APARENTE EN OVINOS**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

AXEL EDMUNDO GUZMÁN CEDILLO

TUTOR:

MVZ, M. en C. Francisco Alejandro Castrejón Pineda

COMITÉ TUTORAL:

MVZ, MPA, Dr. Luis Corona Gochi

MVZ, Dr. Manuel González Ronquillo

México D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres que con su apoyo y motivación me impulsan a seguir adelante. Papá con este proyecto pudimos comprendernos mejor y gracias a tus consejos pude terminarlo.

Mamá con tu aliento a mi lado cada día llegare más lejos.

A Roxana, gracias a tu amor nada me faltó, eres un pilar importante en mi vida, te amo.

A mis hermanos que día a día me enseñan el camino de la vida. Edgar quien me tatuó una piel dorada que jamás podré quitarme, Yunuen quien me enseña que el peso del conocimiento es infinito, pero lo es más la preparación, Yatzin quien me enseña día a día la felicidad en esta vida y la perseverancia para mantenerla.

A mis sobrinos Zabdiel, Azariel y el nuevo integrante que será recibido con los brazos abiertos, son una bella luz que nos ilumina.

A mis abuelos; mamá grande, papá grande, don Lencho, los llevo presente en mis recuerdos y para mama María y tía Otilia mis mejores maestras en el trabajo diario.

A mis cuñados Alejandro, Cuauhtémoc y Silvia que le dan un sabor y toque diferente a la familia.

A mis amigos, aquellos “hermanos y hermanas” con las que pase momentos alegres y difíciles, no saben cuanto los estimo.

A Dr. Mascota por quien me esforzaré día a día y quien me enseña a picar piedra para obtener los frutos que nos da la tierra.

A mis queridos Pumas Acatlán, corazón azul y piel dorada, orgullosos por siempre.

¿Qué es si no la vida, sin los nuevos comienzos que le dan un nuevo sentido a lo que sentimos?

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, por darme todo lo necesario para forjarme como profesional y persona.

A mi asesor Francisco A. Castrejón Pineda por todo el asesoramiento, estímulo y amistad, para seguir adelante.

Al comité tutorial, Luis Corona Gochi y Manuel González Ronquillo, por su disposición y sugerencias que cada día mejoraron este trabajo y mi formación.

Al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica.

Al personal del laboratorio de bromatología Águeda, Fer, Martín, Tere, Ladislau, Hugo, Angel y doña Aure.

Al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal.

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Revisión de literatura	2
2.1. La evaluación de la digestibilidad aparente en rumiantes	2
2.2. Colección total de heces	3
2.3. Otros métodos para determinar la digestibilidad	3
2.3.1. Características de un marcador	5
2.3.2. Los marcadores y su clasificación	5
2.3.3. Marcadores Internos	6
2.3.4. Marcadores externos	9
2.4. Métodos utilizados en el análisis de marcadores externos	14
2.4.1. Espectrofotometría de luz visible (VIS)	14
2.4.1.1. Regiones de la espectrofotometría	15
2.4.1.2. Determinación de la concentración por medio de la espectrofotometría	16
2.4.1.3. Métodos utilizados para la determinación de la concentración por medio de la espectrofotometría.	18
2.4.1.4. Factores a considerar que pueden alterar los análisis de espectrofotometría	19
2.4.1.5. Componentes básicos de un espectrofotómetro	20
2.4.2. Espectrofotometría de emisión de flama y absorción atómica	21
2.4.2.1. Espectrofotometría de emisión de flama	21
2.4.2.2. Interferencia en el análisis de emisión de flama	22
2.4.2.3. Espectrofotometría de absorción atómica	23
2.4.2.4. Partes de un espectrofotómetro de absorción atómica	23
2.5. Técnicas utilizadas para la determinación de Óxido de Cromo (Cr_2O_3).	25
2.5.1. Interferencias	26
2.5.2. Recuperaciones	26
2.6. Técnicas utilizadas para la determinación de TiO_2	27
3. Objetivos	29
4. Hipótesis	29
5. Material y métodos	30
5.1. Experimento 1. Recuperación <i>in vitro</i> de Cr_2O_3 , TiO_2 y sus mezclas	30

5.2. Experimento 2. Evaluación <i>in vivo</i> de los marcadores como marcadores de la digestibilidad aparente	31
6. Resultados y discusión	35
6.1. Experimento 1 Recuperación <i>in vitro</i> de Cr ₂ O ₃ , TiO ₂ y sus mezclas	35
6.1.1. Recuperación de los marcadores en muestra de alimento	35
6.1.2. Recuperación de los marcadores en muestras de contenido duodenal de bovino	37
6.1.3. Recuperación de los marcadores en muestras de contenido duodenal de ovino	38
6.1.4. Recuperación de los marcadores en muestras de heces de bovino	42
6.1.5. Recuperación de los marcadores en muestras de heces de ovino	44
6.2. Experimento 2. Evaluación <i>in vivo</i> de los marcadores como marcadores de la digestibilidad aparente en ovinos	47
6.2.1. Dietas y consumo de materia seca	47
6.2.2. Recuperación de los marcadores <i>in vivo</i>	50
6.2.3. Consumo de Nitrógeno y recuperación en heces	52
6.2.4. Comparación de la estimación del coeficiente de digestibilidad aparente del tracto digestivo total.	53
7. Conclusiones	56
8. Bibliografía	57

RESUMEN

Se evaluaron dos marcadores Cr_2O_3 , TiO_2 y técnicas utilizadas para su determinación: espectrofotometría de absorción atómica (EAA) y espectrofotometría visible (VIS), *in vitro* se adicionó cada marcador en diferentes niveles a muestras de alimento, contenido duodenal (0.4, 0.8, 1.2 y 1,6%) y heces (bovino y ovino) (0.8, 1.6 2.4 y 3.2%), *in vivo* se utilizaron 6 ovinos macho en un diseño experimental cuadrado latino con ajuste por efecto residual. *In vitro*: El Cr_2O_3 y $\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$ en todas las muestras analizadas por EAA, en los niveles de marcador 1.6 a 3.2% arrojaron recuperaciones cercanas a 100%. Las recuperaciones fueron diferentes ($P<0.05$) en las muestras analizadas con TiO_2 y $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$ en cada nivel, por ambas técnicas. *In vivo*: la variación encontrada *in vitro* no afectó los coeficientes de digestibilidad aparente obtenidos por medio del TiO_2 y $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$ ya que predijeron valores similares a los obtenidos por colección total de heces (CTH) o la utilización de Cr_2O_3 , determinados tanto por EAA como por VIS. La mezcla $\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$ determinado por VIS y EAA dio resultados menores a CTH ($P<0.05$). El uso de TiO_2 solo o mezclado con cromo ($\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$) puede ser una alternativa a CTH y Cr_2O_3 , para la estimación de la digestibilidad aparente del tracto digestivo total en ovinos.

Palabras clave: colección total de heces, espectrofotometría de absorción atómica, espectrofotometría visible, marcadores y digestión.

ABSTRACT

Cr_2O_3 and TiO_2 were evaluated, and mixture, as well the technique used for determining: atomic absorption spectrophotometry (AAS) and visible spectrophotometry (VIS) *in vitro* was added to each marker at different levels in samples feed, duodenal content (0.4, 0.8, 1.2 y 1,6%) and feces (steers and sheep) (0.8, 1.6 2.4 y 3.2%), *in vivo* 6 male sheep were used according to an experiment design Latin square for adjustment residual effects. *In vitro*: The Cr_2O_3 and $\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$ in all samples analyzed by AAS, marker levels 1.6 to 3.2% yielded recovery close to 100%. The recoveries were different ($P <0.05$) in all the samples analyzed by both techniques at each level of TiO_2 and $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$. *In vivo*, the variation found *in vitro* did not affect apparent digestibility coefficients obtained by TiO_2 and $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$ as predicted similar values to those obtained by total fecal collection (TFC) or the use of Cr_2O_3 , determined both by AAS and VIS. The mixture $\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$ determined by AAS and VIS gave results less than TFC ($P<0.05$). The use of TiO_2 alone or in mixture with chromium ($\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$) could be an alternative to TFC and Cr_2O_3 in the estimation of total tract apparent digestibility in sheep.

Keywords: total fecal collection, atomic absorption spectrophotometry, visible spectrophotometry, markers and digestion.

Introducción

La correcta evaluación de la digestibilidad de los alimentos en los animales, por distintas técnicas permite conocer su grado de aprovechamiento (Church *et al.*, 2003; Shimada, 2003;).

Dentro de estas técnicas para su evaluación, está el uso de marcadores, que son sustancias inertes e indigestibles que ayudan a conocer la digestibilidad de los alimentos de una forma práctica y sencilla (Church *et al.*, 2003), pero la evaluación de estas sustancias, en cuanto a recuperación y concentración *in vitro* e *in vivo*, permite asegurar la correcta estimación de la digestibilidad de la dieta.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Evaluación de la digestibilidad aparente en rumiantes

La necesidad de conocer la composición y evaluación de los alimentos, para determinar su valor nutricional, permite determinar su selección e interacción con otros ingredientes para elaborar una ración que sea capaz de cumplir los requerimientos productivos (Shimada, 2003). Con base en lo anterior, la información obtenida por un buen análisis químico, puede llegar a ser confiable. Sin embargo esto sólo indica el contenido de nutrientes, pero no su disponibilidad para el animal, por lo que es importante contar con los datos de la digestibilidad de dicho alimento (Shimada, 2003). La digestibilidad está determinada por el porcentaje de un nutriente que se digiere y absorbe en su paso por el tubo gastrointestinal (Church *et al.*, 2003; Cooke, 1998; Shimada, 2003). La mayoría de los métodos para medirla, consiste en ofrecer cantidades determinadas de un alimento de composición conocida a un animal. De esta forma se mide y analiza lo que es excretado, ya sea a través del método de colección total de heces (CTH) o incluso por medio de obtención de muestras de contenido gastrointestinal (Church *et al.*, 2003; Cooke, 1998; Ørskov, 1986).

2.2. Colección total de heces

En esta técnica se recomienda mantener una ingestión diaria de alimento constante, lo cual se logra restringiendo la cantidad de alimento ofrecido al 90% de la cantidad de consumo voluntario, previa al periodo de muestreo, a fin de disminuir la variación que se presenta de un día al otro en la producción de excretas. Los residuos de un alimento, en el caso de los rumiantes, atraviesan el conducto gastrointestinal en un lapso de 3 a 10 días. De esta forma para la administración y estudio de un nuevo alimento, es importante considerar este tiempo, así mismo una adecuada adaptación a este se lleva a cabo en un período de 4 a 10 días, y así poder recolectar las muestras correspondientes al alimento en estudio después del período mencionado; ya que la variabilidad de digestibilidad entre animales, es mínima, la posibilidad de contar con 4 o 6 animales por tratamiento para su estudio, resulta conveniente (Church *et al.*, 2003; Ørskov, 1986).

La digestibilidad aparente utilizando la CTH, se calcula con la siguiente formula:

$$\text{DIGESTIBILIDAD APARENTE} = 100 * [(\text{NutsIng} - \text{Nutshcs}) / \text{NutsIng}]$$

Donde: NutsIng son los nutrientes en ingredientes (g/d) y Nutshcs son los nutrientes en heces (g/d).

En estos estudios, parte del contenido en heces, como; nitrógeno, grasas, carbohidratos y elementos inorgánicos, provienen de fuentes externas al alimento. Es decir, algunas células de la mucosa gastrointestinal, secreciones, etc.; por tanto las heces contienen alimento sin digerir y material endógeno (Church *et al.*, 2003; Owens y Handson, 1992). Debido a esto, al cuantificar la digestibilidad por medio del análisis de heces, se obtiene una digestibilidad aparente (Church *et al.*, 2003; Ørskov, 1986).

2.3. Otros métodos para determinar la digestibilidad

El uso de sustancias de referencia para medir la digestibilidad, cuando no es factible la recolección total de heces, se presentan como: no absorbibles y por lo tanto indigeribles, no tóxicas y deben resultar de fácil detección en heces. Estas sustancias son conocidas como indicadores o marcadores de digestibilidad. (Church *et al.*, 2003). Estos marcadores se adicionan al alimento, o son parte del mismo o administrados de forma oral (Kotb y

Luckey, 1972; Lachman y Araujo, 2005). Permiten realizar ensayos sin la CTH, tanto para animales estabulados o en pastoreo (Lachman y Araujo, 2005; Fahey y Jung, 1983), siempre y cuando se conozca la concentración del marcador en el alimento y heces, es decir por medio de las proporciones de este (Van Soest, 1994).

El uso de marcadores por medio de proporciones, simplifican la determinación de la digestibilidad, y al conocer la composición porcentual de nutrientes del alimento y de las heces, se puede determinar la digestibilidad de los nutrientes (Church *et al.*, 2003; Kane *et al.*, 1950).

El uso de fórmulas para el cálculo de la digestibilidad aparente con marcadores por medio del método de proporciones, se puede dar en la relación de las concentraciones de los nutrientes y el marcador en alimento y heces (Kotb y Luckey, 1972).

Utilizando la siguiente fórmula es posible conocer la producción de heces:

$$\text{Producción de heces MS g/d} = (\text{marcador consumido g/d}) / (\text{marcador en heces g/d})$$

Para el cálculo de la digestibilidad de la materia seca con marcadores se usa la siguiente ecuación:

$$D \text{ MS} = 100 * (\text{Consumo de MS g/d} - \text{Producción de MS en heces g/d}) / \text{Consumo de MS g/d}$$

Para la estimación de la digestibilidad de componentes (MO, FDN)

$$\text{Digestibilidad de X} = 100 * [(\text{Consumo de X g/d} - \text{Excreción de X g/d}) / \text{Consumo de X g/d}]$$

Donde X= MO, FDN, N, etcétera.

Donde el consumo y excreción están en gramos por día y el Coeficiente de digestibilidad en porcentaje.

Los coeficientes de digestibilidad pueden ser ajustados con base en lo obtenido a la CTH (Lachman y Araujo, 2005), siendo justificada para aquellos marcadores que son parte del

alimento (Van Soest, 1994), ya que estos marcadores por ciertas características, que se describirán más adelante, llegan a variar en cantidad y composición dentro del alimento.

2.3.1. Características de un marcador

Una sustancia que pretenda ser utilizada como marcador debe ser inerte y no tóxica, no tener efectos fisiológicos, no debe ser absorbida ni metabolizada en su paso por el tracto digestivo y deberá ser recuperada totalmente de la muestras del alimento y mantenerse uniformemente distribuida en el material digerido o en la excreción, no tener efecto sobre la micro flora del tracto digestivo y además de ser fácil y preciso análisis (Kotb y Luckey, 1972)., sumado a esto, no debe afectar al animal, ni a la digestibilidad del alimento (Robertson y Van Soest, 1981).

Los marcadores son ampliamente utilizados para estudios de digestibilidad, tanto para animales en pastoreo como en estabulación (Fahey y Jung, 1983). El uso de marcadores es útil cuando se dificulta medir el consumo total del alimento o incluso si la colección total de heces resulta complicada (Church *et al.*, 2003; Lachman y Araujo, 2005). También se utilizan cuando se requiere conocer el sitio de digestión en el tracto digestivo. Para lo cual, se emplean animales canulados (rumen, abomaso, intestino delgado, íleon etc.)

2.3.2. Los marcadores y su clasificación

Los marcadores son clasificados en internos y externos. Los internos son aquellos que están presentes dentro del alimento y son muy poco o totalmente indigeribles (Church *et al.*, 2003). Los marcadores internos más utilizados en estudios de digestibilidad son: lignina (Church *et al.*, 2003; Lachman y Araujo, 2005; Van Soest, 1989), sílice (Church *et al.*, 2003; Lachman y Araujo, 2005), ceniza insoluble en ácido (Church *et al.*, 2003; Sales y Janssens, 2003) y recientemente ha aumentado el uso de n-alcanos (Dove y Mayes, 1991; Piasantier *et al.*, 1995; Steven *et al.*, 2002; Ayala 2005).

Los marcadores externos son añadidos al alimento, agua e incluso se introducen directamente en rumen o por la vía oral (Church *et al.*, 2003). Generalmente estos marcadores son compuestos químicos, los cuales se agregan al alimento generalmente son colorantes, insolubles y no tóxicos.

Los marcadores externos más utilizados son: Óxido de Cromo (Cr_2O_3) (Perez *et al.*, 1994); elementos de tierras raras como Lantano (La) (Austreng *et al.*, 2000), Cerio (Ce)

(Gidenne y Lapanouse, 1997), Samario (Sm) (Church et al., 2003), Iterbio (Yb) (Austreng et al., 2000; Perez et al., 1994) y Disproso (Dy) (Imbeah et al., 1995), estos últimos se utilizan para estimar la cinética de la digestibilidad (Church et al., 2003). Otro marcador utilizado es el Dióxido de titanio (TiO₂) (Peddie et al., 1982; Titgmeyer et al., 2001; Myers et al., 2004).

2.3.3. Marcadores internos

Lignina

La lignina es un polímero de las plantas, su definición y componentes no están claramente reconocidos. Es un polímero condensado de fenil propanoide de alto peso molecular, la clasificación de la lignina se basa en sus monómeros estructurales y de la clasificación taxonómica de la planta, si son monocotiledóneas o dicotiledóneas por lo tanto, la definición de la lignina llega a ser diferente en la literatura (Lachman y Araujo, 2005).

La lignina es utilizada en estudios de digestibilidad principalmente con rumiantes, las pérdidas y retenciones durante su análisis generan resultados incorrectos (Lachman y Araujo, 2005) e incluso, nutrientes como la proteína cruda en la fibra detergente neutro (PCFDN), afectan la determinación de fibra detergente ácido (FDA) (Lachman y Araujo, 2005), ya que el 1.5 y 18 % de la lignina puede estar representado por proteína.

La determinación de lignina puede afectarse por la composición de diferentes forrajes e incluso una alteración por el uso de ácidos fuertes que causen que el material soluble, por medio de una polimerización y condensación, se vuelva insoluble (Van Soest, 1994), se ha concluido que la lignina es indigerible, cuando en realidad, se desconoce su solubilidad en condiciones naturales (Lachman y Araujo, 2005).

La degradación parcial de la lignina en el tracto digestivo es un tema de discusión, puesto que se cree indigestible, pero algunos investigadores creen que esta llega a ser digerida aparentemente en el rumen e intestinos (Fahey y Jung, 1983). Siendo posible por la formación de complejos solubles de lignina y carbohidratos, generando polímeros en solución que no son excretados (Lachman y Araujo, 2005), por lo que la lignina no es una sustancia inerte en su paso a través del tracto digestivo de los rumiantes. Por otra parte, los forrajes jóvenes presentan una menor cantidad de lignina con respecto a los maduros, dificultando su recuperación y análisis, por lo que el uso de lignina como marcador en forrajes inmaduros es restringido (Lachman y Araujo, 2005).

El contenido de lignina superior al 5% en la materia seca (MS) dentro de un forraje permite una mejor recuperación (Van Soest, 1994), cabe resaltar que la mayoría de los

estudios realizados sobre recuperación de lignina ha sido en plantas de clima templado (Lachman y Araujo, 2005). Con base en lo anterior, conociendo las limitantes en pérdidas y análisis de este marcador, así como un factor de corrección por medio del método de CTH, permiten un ajuste válido de la lignina como un marcador de la digestibilidad, en animales con alimentación controlada, no necesariamente es aplicable a animales con alimentación en pastoreo (Lachman y Araujo, 2005).

Sílice

La utilización del compuesto formado por silicio y oxígeno, originan dióxido de silicio (SiO_2), el cual es llamado comúnmente sílice que es el componente principal de la arena y algunos cereales tales como avena, cebada y arroz (Church et al., 2003). Fue de los primeros marcadores propuestos como indicador para evaluar la digestibilidad, pero se ha demostrado que su recuperación es variable, posiblemente debido a problemas de absorción, excreción urinaria y contaminación con suelo (Kotb y Luckey, 1972), su uso se recomienda para la evaluación de consumo en pastoreo.

Ceniza insoluble en ácido

La ceniza insoluble en ácido (CIA) se considera que representa la contaminación normal de tierra por parte del alimento que no es digerido y ofrece un alto grado de recuperación del marcador en las heces (Sales y Janssens, 2003), su procedimiento como marcador llega a ser confiable para determinar la digestibilidad fecal en las especie animales en determinadas circunstancias y con la aplicación de algunas precauciones (Sales y Janssens, 2003), tales como el contenido de CIA en los alimentos de al menos 0.75%.

Las variación fecal diurna, según Pina (2006), puede afectar los resultados o incluso se puede ausentar esta variación en aves de corral, ovejas, cerdos, como lo reportan Sales y Janssens (2003). La mayoría de los errores en su recuperación pueden ser debidos a fallas analíticas en el uso de alimentos con bajo contenido de CIA (Sales y Janssens, 2003). Son necesarios mas estudios sobre la velocidad y el ritmo de flujo del la CIA, para poder predecir la digestibilidad en condiciones de campo. También se encontró bajos niveles de CIA en dietas basadas en cereales, por lo que es necesario la adición de 0.5 % de Zeolita (Celite) (Kavanagh *et al.*, 2001) dando recuperaciones del $99.9 \pm 2.27\%$ en cerdos y valores similares a la CTH.

Fibra detergente ácido o neutro indigestible

La fibra detergente ácido o neutro indigestible presenta una recuperación de 98% en heces y su uso como indicador de la digestibilidad es posible, pero tomando en cuenta la variación en la que influye el tamaño de la partícula y el estado de madurez de la planta.

Los resultados obtenidos con tan sólo dos días de recolección han demostrado que la fibra detergente neutro es un buen estimador de la excreción fecal de materia seca, digestibilidad de la dieta y sus nutrientes (Pina *et al.*, 2006).

n-Alcanos

Los alcanos son constituyentes de las superficies de insectos y vegetales, presentes en la superficie tisular la cual forma la cera cuticular que cubre la mayor parte aérea de los vegetales (Dove y Mayes, 1991; Steven *et al.*, 2002), representan casi 50% de la pared celular de las plantas. Están presentes en la hoja, fruto y flor, excepto el tallo y ramas maduras de arbustivas y arbóreas (Piasantier *et al.*, 1995), son parte de una barrera contra el frío, el calor y los microorganismos (Dove y Mayes, 1991; Steven *et al.*, 2002).

Los n-alcanos son hidrocarburos de cadena larga saturados, el prefijo n (normal) se refiere a que la cadena no está ramificada, contienen enlaces sencillos y compuestos (Piasantier *et al.*, 1995). Son insolubles en agua, por que son no polares, tienden a ser volátiles a medida que aumentan de peso molecular; a temperatura ambiente son sólidos con apariencia de cera (Piasantier *et al.*, 1995), para su identificación es necesaria la cromatografía de gases (Dove y Mayes, 1991; Steven *et al.*, 2002), su recuperación llega a ser variable en heces (lo que es su mayor desventaja), ya que influye la edad, estado fisiológico y especie del animal, así como la especie y estado fenológico por parte de la planta, el clima también influye sobre la cantidad de n-alcanos presentes en la planta (Piasantier *et al.*, 1995).

Los hidrocarburos de cadena larga (C19 y C32) fueron sugeridos para utilizarse como marcadores internos en la década de 1950-60. Sin embargo, fue difícil su análisis para la época en que fueron propuestos (Dove y Mayes, 1991; Steven *et al.*, 2002). El consumo individual se puede obtener mediante el uso de los n-alcanos (Dove y Mayes, 1991).

Para su utilización es necesario conocer el perfil de n-alcanos por especie vegetal, etapa de maduración y parte de la planta, para que la composición calculada sea similar a la consumida (Piasantier *et al.*, 1995).

La indigestibilidad de los n-alcanos, permite que las pérdidas sean bajas: 0.05-17% (Steven *et al.*, 2002). Su mayor desaparición esta entre el duodeno y el íleon (Dove y

Mayes, 1991). La secreción de n-alcanos por parte de la microflora intestinal es insignificante (0.0004%) (Steven *et al.*, 2002), por lo que no afecta la determinación de la digestibilidad por la variación en el contenido de n-alcanos. Los n-alcanos han permitido separar los forrajes de clima templado y tropical, por familia, gramíneas y leguminosas, son útiles también para la identificación de los forrajes por especie, en praderas homogéneas, (Dove y Mayes, 1991; Steven *et al.*, 2002), mientras en praderas heterogéneas no es posible la distinción de los forrajes por especie, si bien la relación de n-alcanos nos sirve para poder evaluar la digestibilidad en forma similar a la CTH (Ayala 2005), así como también resultan eficientes para obtener el consumo de materia seca ya que ofrece un resultado cercano al método de CTH (Piasantier *et al.*, 1995).

2.3.4. Marcadores externos

Como se había mencionado anteriormente, los marcadores externos no forman parte del alimento, son utilizados para evaluar la digestibilidad, producción fecal y el consumo voluntario, entre los cuales se encuentran:

Óxido de Hierro

El óxido de Hierro (Fe_2O_3) fue utilizado como marcador para identificar el inicio y final del periodo de colección de muestras en cerdos (Farrell *et al.*, 1983). Compuesto que difícilmente se mezcla con el bolo alimenticio, llegando a acumularse en rumen; por lo que su uso es limitado en rumiantes (Ayala, 2005).

Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) resulta extremadamente soluble en agua, por lo que es utilizado como marcador de fluidos (Russell *et al.*, 1982), con una recuperación alta en heces y pocos problemas al analizarlo. Sin embargo, se precipita con taninos al ofrecerse con alimentos ricos en estos compuestos (Ayala, 2005). El análisis de este marcador se realiza por medio de la determinación de la turbidez que produce en una solución, se estabiliza para su lectura a 360 nm con ácido tricloroacético (Russell *et al.*, 1982).

Polietileno

Utilizado en equinos con 3.5 % de inclusión, dio resultados similares a la CTH con recuperación de 103.2%, la elevada recuperación es atribuida a la pérdida de humedad

que puede ocurrir en el lapso entre la colección y el deshidratado. Puesto que esta pérdida incrementa la cantidad de materia seca extraída y así indirectamente elevar la estimación del marcador, (Knapka *et al.*, 1992) de modo que debe hacerse el ajuste correspondiente. Por otra parte con 5% de inclusión, se obtuvieron resultados menores a la CTH (Chandler *et al.*, 1964)

Sulfato de plata

El componente iónico sulfato de plata (Ag_2SO_4) resulta ser un marcador insoluble en el tubo digestivo, su recuperación y análisis en heces resulta adecuado, pero es costoso y esa desventaja limita su uso (Ayala, 2005).

Tierras raras

Elementos ampliamente distribuidos en la naturaleza pero en bajas concentraciones, son metales que poseen la propiedad de ser sensibles a la temperatura y la presión, son treinta elementos que constituyen la serie de los lantánidos y actínidos. Todos ellos pertenecientes a los periodos 6 y 7 de la tabla periódica.

Su uso como marcadores inertes, es por medio de óxidos, de ahí el termino de tierras, tales como; el óxido de lantano (La_2O_3), óxido de itrio (Y_2O_3) y el óxido de iterbio (Yb_2O_3) pueden ser utilizados exitosamente para determinaciones de digestibilidad (Austreng *et al.*, 2000), e incluso resultan en valores similares a los obtenidos con el óxido de cromo. Su uso es principalmente para estimar la cinética de la digestión, la rapidez de paso, y los tiempos de retención de diferentes nutrientes de los alimentos, ingredientes y partículas (Church *et al.*, 2003). El uso del Cerio (Ce) da buenos resultados, sin embargo, su uso es limitado debido a la radio-contaminación (Knapka *et al.*, 1992).

Fibra de Cromo Mordiente

Se fundamenta en atrapar el Cromo (Cr) a la fibra vegetal a través de enlaces, que permanecen a través del tracto digestivo, la densidad de la fibra y la tasa de pasaje de esta puede ser diferente a la de la fibra no marcada. Es utilizado para estudios de digestibilidad y para determinar el avance del bolo alimenticio (Ayala, 2005; Van Soest, 1994). Se recomiendan bajos contenidos de Cr para minimizar el efecto de la densidad y la tasa de pasaje de la fibra, densidades menores a 2.08 g/ml, ya que esta cantidad es suficiente para depositarse en el fondo del rumen y generar los efectos indeseables del marcador, por lo que las concentraciones de Cr entre 2 y 4% del peso de la fibra llegan a

controlar estos problemas (Van Soest, 1994). Se han encontrado variaciones diurnas en la excreción del marcador, por lo que se debe tomar muestras de contenido rectal a diferentes horas, para determinar la curva de excreción del marcador (Van Soest, 1994; Lachman y Araujo, 2005).

Oxido de cromo

El óxido de cromo (Cr_2O_3) fue introducido como marcador en 1918 por Edin (Knapka *et al.*, 1992). Por sus características inertes ha sido uno de los marcadores más antiguos y utilizados en estudios de digestibilidad (Lachman y Araujo, 2005). Prácticamente resulta insoluble en agua y no se asocia con el alimento, recorre el tracto digestivo en forma de suspensión, llegando a sedimentarse en el retículo-rumen y de forma esporádica llega a los intestinos, lo que puede llevar a una variación en el patrón de excreción (Van Soest, 1994).

En cuanto a su recuperación en heces, la variabilidad en los resultados puede deberse a la fineza de moler el marcador que lleva a su retención por el tracto gastrointestinal, esto permite explicar recuperaciones bajas del marcador (Jagger *et al.*, 1991), además la excreción de este en rumiantes llega a presentarse en recuperaciones menos precisas, debido a una excreción fecal irregular (Lachman y Araujo, 2005). Puesto que la técnica depende básicamente del muestreo, es posible evitar el efecto de la variación diurna, al realizarlo dos veces al día (Van Soest, 1994; Lachman y Araujo, 2005). En el caso de reportes con recuperación completa o superior a 100%, puede deberse a la variabilidad entre las metodologías de los programas experimentales (Jagger *et al.*, 1991). Sin embargo ha sido asociado con muchos problemas como una recuperación inconstante, puede oxidar la grasa insaturada (Jagger *et al.*, 1991) así como un cuidadoso empleo, por lo que resulta ser carcinogénico para el que lo utiliza y de forma crónica para el animal (Lachman y Araujo, 2005). Se ha indicado que las recuperaciones del 93 al 98% no defieren, del uso en jaulas metabólicas como en pastoreo (Piasentier *et al.*, 1995) En estos últimos ensayos su empleo puede ser por medio de la administración en cápsulas de gelatina, una o dos veces al día, resultando más exacta la determinación de la excreción fecal, aunque algunas ocasiones su administración no suele coincidir con lo excretado (Owens y Handson, 1992).

La determinación de este marcador puede realizarse con diferentes técnicas colorimétricas o de espectrofotometría de luz ultravioleta-visible (UV/VIS) como: Hill y Anderson (1958); Fenton y Fenton (1979); Czornocki *et al.* (1961) y Kozloski *et al.* (1998)

y de espectrofotometría o espectrofotometría de emisión de flama (EEF) o absorción atómica (EAA) como: Williams *et al.*, (1962); Robinson *et al.*, (1987); Fadel *et al.* (1987) y Yiakoulaki *et al.* (1997). Entre estas técnicas existe variación en las cantidades de muestra a analizar, uso de diferentes sustancias para la digestión de las muestras, así como la obtención de cenizas ya sea por incineración o digestión húmeda y en el caso de colorimetría diferentes longitudes de onda, las cuales se describen mas adelante.

La comparación entre los métodos colorimétrico determinado por luz ultravioleta-visible (UV/VIS) y espectrofotometría de emisión de flama (EEF) resultaron en diferentes recuperaciones entre los dos métodos donde fue mayor la recuperación a través de la EEF (Carciofi *et al.*, 2007), pero en los coeficientes de digestibilidad obtenidos por ambos métodos no se encontró diferencia significativa, resultado similares se obtuvieron al utilizar una longitud de onda de 350 nm en VIS (Kozloski *et al.*, 1998)

La digestión ácida de la muestra para la determinación de este marcador puede causar pérdida por la volatilización o formación de compuestos insolubles (Christian y Coup, 1954 y Mir *et al.*, 1989). En cerdos su recuperación de forma individual por medio de la técnica de Fenton y Fenton, 1979 dio recuperaciones de 74.6 % y 79.7% en dietas adicionadas con 1 y 5 g de Cr₂O₃ por Kgkg alimento, respectivamente, por otra parte su uso de forma combinada con dióxido de titanio ha dado recuperaciones de 93% por medio de un análisis con la técnica de EAA Williams *et al.* (1962) (Kavanagh *et al.*, 2001). En cambio un estudio llevado a cabo con novillos, el porcentaje de recuperación fue de 112.3% utilizando la misma técnica de análisis de concentración de EAA (Titgemeyer *et al.*, 2001). Adicionalmente el uso del Cr₂O₃ como aditivo en dietas de animales no es aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en los Estados Unidos de América (Titgemeyer *et al.*, 2001).

Dióxido de titanio

El dióxido de titanio (TiO₂) tiene gran importancia como pigmento blanco por sus propiedades de dispersión, su estabilidad química y su no toxicidad. El dióxido de titanio es el pigmento inorgánico más importante en términos de producción mundial. Empieza a ser utilizado como marcador de la digestibilidad en algunas especies como; ratas (Krawielitzki *et al.*, 1987), cerdos (Jagger *et al.*, 1991), pollos (Short *et al.*, 1996), vacas de leche (Hafez *et al.*, 1998), y novillos (Titgemeyer *et al.*, 2001).

En los últimos años el dióxido de titanio (TiO₂), se presenta como una alternativa al uso del Cr₂O₃ (Myers *et al.*, 2004; Titgemeyer *et al.*, 2001; Peddie *et al.*, 1982), ya que los

estudios realizados con este marcador, demuestran que su recuperación no es al 100%. El TiO_2 ha sido poco estudiado como marcador de digestibilidad para los rumiantes, siendo mayormente utilizado en aves y cerdos (Jagger *et al.*, 1991; Short *et al.*, 1996).

De acuerdo con Leone en 1973 y con una técnica similar propuesta por Jagger *et al.* (1991), su determinación se basa en el uso del H_2O_2 para su análisis por medio del cambio del Ti^{4+} incoloro, hacia un color naranja, puesto que al transformarse en Ti^{3+} es de un color violeta (Barriel, 1999), sin embargo la mezcla de TiO_2 y H_2O_2 forma H_4TiO_5 (Snell y Snell 1949). A su vez, Vogel *et al.*, (1989) sugirieron que el ion formado es $\text{TiO}_2(\text{SO}_4)^{2-}$. Por lo que ambos compuestos pueden estar presentes con la reacción inicial que forma H_4TiO_5 que disocia en el $\text{TiO}_2(\text{SO}_4)^{2-}$, formando el color anaranjado (Jagger *et al.*, 1991). Muhlebach *et al.*, (1970), informaron que el color de la reacción de $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ es anaranjado debajo de un pH ácido de 1, se pone amarillo alrededor de un pH 3, y gradualmente disipa conforme aumenta el pH hacia la región alcalina. Leone (1973), afirma que los elementos causantes de interferencias con el Ti, son el Hierro (Fe), Niquel (Ni), Cobre (Cu), Cobalto (Co), Molibdeno (Mb) y Cromo (Cr), sin embargo Kavanagh *et al.*, (2001), Titgemeyer *et al.*, (2001) y Jagger *et al.*, (1991) utilizaron el Cr y el Ti combinados sin interferencias en su análisis, con métodos colorimétricos.

En otros estudios, el uso del TiO_2 sobre el Cr_2O_3 en pollos de engorda, resultó más confiable que el cromo como marcador de la digestibilidad, siendo menos variable y obteniéndose mayor digestibilidad, lo cual indica una mayor recuperación (Short *et al.*, 1996). El uso de este marcador para evaluar el contenido de energía metabolizable de los alimentos en aves de corral, dio resultados de recuperación en heces del 98%, superiores al Cr (Sales y Janssenes, 2003).

En cerdos las recuperaciones obtenidas a partir de dietas adicionadas con 1 y 5 g/kg de alimento fueron de 98.3% y 96.9% respectivamente por medio de la técnica de Jagger *et al.*, (1991). En combinación con Cr_2O_3 el TiO_2 dio recuperaciones menores que el primero siendo 96% y 92.3% respectivamente cuando se utilizó la técnica de Short *et al.*, (1996), los coeficientes de digestibilidad obtenidos resultaron menores para el TiO_2 con respecto a la CTH y sin diferencias para CIA y Cr_2O_3 (Kavanagh *et al.*, 2001).

En el caso de ganado bovino, se encontró una excreción constante de 94.6% y sin diferencias a partir de los días 7 al 21, también demostró que puede ser utilizado para estimar la digestibilidad en dietas para rumiantes, ya que dio recuperaciones fecales del 90% al 95% (Titgemeyer *et al.*, 2001) sin embargo al comparar los coeficientes de

digestibilidad obtenidos con el TiO_2 y la CTH, se encontró una subestimación de los valores obtenidos a partir del titanio entre 1.1 y 5.5 unidades porcentuales.

Con base en lo anterior, el uso de este marcador puede ser una opción para la investigación ya que es inerte, sin embargo su análisis, por medio de la espectrofotometría de absorción o emisión, no ha sido citado en estudios de digestibilidad.

2.4. Métodos utilizados en el análisis de marcadores externos

La mayoría de los marcadores utilizados llegan a ser excretados por los animales sin que estos interactúen con el alimento o en los mismos procesos fisiológicos de la digestión (Cavalieri *et al.*, 2007), posteriormente son cuantificados en heces, por lo que la precisión en su análisis de laboratorio y recuperación total resultan esenciales para un apropiado estudio de digestibilidad (Saha y Gilbreath, 1991).

La detección de la concentración del marcador en heces puede realizarse por medio de la espectrofotometría de luz ultravioleta-visible (UV/ VIS) y la espectroscopía o espectrofotometría de absorción atómica (EAA) o de emisión de flama (EEF). Las diferencias entre cada metodología están dadas por la absorbancia obtenida por la sustancia (UV/VIS) o la absorbancia dada por los átomos libres del elemento a estudiar (EEF).

2.4.1. Espectrofotometría de luz ultravioleta-visible

Las moléculas pueden absorber la energía de la luz y almacenarla como energía, de esta forma es posible la medición de la luz que transmite una solución para determinar la concentración, por medio de la luz que absorbe el material presente en la solución (Softley, 1994). La espectrofotometría es utilizada para análisis de minerales, vitaminas, constituyentes sanguíneos y otros compuestos (Barriel, 1999), es ampliamente utilizado en laboratorios debido a su bajo costo (Kozloski *et al.*, 1998). El principio de la espectrofotometría, es aplicado, al observar una solución y determinar en cual existe una mayor concentración tan solo con la intensidad del color que presente (Barriel, 1999).

Las unidades de medida en la espectrofotometría son la transmitancia y absorbancia. Entendiéndose como transmitancia; "La medida de la intensidad de la luz que emerge de

una solución y de la luz que incide en la solución” (Fritz y Schenk, 1979). La transmitancia puede ser expresada como:

$$T = I_s/I_e$$

Donde:

- T = Transmitancia
- I_s = intensidad de la luz saliente
- I_e = intensidad de la luz que entra.

En la práctica no se miden las intensidades de luz, pero sí se utiliza el paso de la luz al ser absorbida por el material un una solución (Fritz y Schenk, 1979). Los valores de transmitancia van del 0 al 1.0, generalmente se expresan en porcentaje (Barriel, 1999).

La absorbancia o densidad óptica (D.O) es el logaritmo negativo de la transmitancia y es utilizada sobre esta, ya que en ciertas condiciones, la luz absorbida es directamente proporcional a la concentración del material en la solución (Fritz y Schenk, 1979; Barriel, 1999; Softley, 1994).

2.4.1.1. Regiones de la espectrofotometría

Las regiones del espectro electromagnético comúnmente utilizadas en la espectrofotometría resultan ser la luz visible, infrarroja y ultravioleta (UV) (Barriel, 1999), siendo para la luz visible la medición de la luz, que absorbe un ion o molécula por si mismo (Fritz y Schenk, 1979). La presencia de color en la solución absorberá luz en cualquiera de las regiones infrarroja o ultravioleta. En el caso de compuestos que no absorben cantidades apreciables de luz, se utiliza una reacción que produzca un complejo que realmente la absorba, como sucede en el análisis de glucosa o fósforo (Fritz y Schenk, 1979, Barriel, 1999).

La energía luminiscente es caracterizada de acuerdo a una longitud de onda, la cual es medida en nanómetros (nm), donde un nm equivale a 10^{-9} metros (Fritz y Schenk, 1979).

La longitud de onda será específica al color visible de la solución a analizar, puesto que la luz absorbida por ésta se encuentra en una región específica como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Color de luz visible y absorbida de acuerdo a su longitud de onda (λ)
(Barriel, 1999).

λ (nm)	Color visible	Color absorbido
400-420	Verde-Amarillento	Violeta
429-450	Amarillo	Violeta-Azul
450-490	Naranja	Azul
490-510	Rojo	Azul-Verde
510-545	Púrpura	Verde
545-580	Violeta	Verde-Amarillo
580-630	Azul	Amarillo
630-720	Azul-Verde	Rojo

En la colorimetría, puede representarse a grandes rasgos el color obtenido a partir de los iones a analizar, los aniones son incoloros y los cationes tienen color (Barriel, 1999).

Las demás regiones UV e infrarroja, presentan diferentes intervalos siendo las superiores para la luz infrarroja con más de 750 nm, e inferiores para luz UV de 10 a 380 nm (Fritz y Schenk, 1979). La absorción de la luz está en función de la longitud de onda que es capaz de absorber cada elemento químico, ya que la longitud de onda corresponde a la energía necesaria para causar un cambio en la configuración electrónica del compuesto químico (Fritz y Schenk, 1979). Debido a que la absorción de luz por las moléculas, genera cambios eléctricos, vibracionales y rotacionales en su composición (Softley, 1994).

Los cambios eléctricos se deben a que la energía de los electrones en la molécula, es cambiada (Softley, 1994). Los cambios vibracionales suceden cuando se modifica la distancia entre los núcleos de dos o más átomos, y los rotacionales suceden cuando una molécula gira alrededor de un centro gravitacional (Fritz y Schenk, 1979). La variedad de cambios en la molécula que pueden suceder por la absorción de luz depende de la longitud de onda a la que es expuesta la molécula, por lo que es importante seleccionar la longitud de onda donde se presente la mayor absorbancia (Fritz y Schenk, 1979; Softley, 1994).

2.4.1.2. Determinación de la concentración por medio de la espectrofotometría

La determinación de la concentración en una solución por medio de su análisis con espectrofotometría puede realizarse aplicando la ley de Beer, ya que un espectrofotómetro proveerá de una fuente de luz con una determinada longitud de onda, la cual es determinada de acuerdo al espectro electromagnético de la sustancia a analizar, por medio de una serie de sustancias con concentraciones conocidas, que son llamadas estándar, a las cuales se obtendrá su absorbancia por medio de un espectrofotómetro (Softley, 1994).

Una vez que el espectro de absorción ha sido determinado, es posible aplicar el principio de la espectrofotometría para determinar la concentración de un compuesto en una solución. Como se mencionó dentro de los principios de la espectrofotometría destaca la ley de Beer que nos indica; “para la transmitancia de una solución que contiene al material, la absorción de luz dependerá de la naturaleza de la solución, la longitud de onda, la distancia de la fuente de luz y la concentración de la sustancia” (Fritz y Schenk, 1979, Softley, 1994), expresándose como:

$$T=10^{-klc}$$

Donde “k” es la constante para la sustancia, “l” es la distancia de la fuente de luz y “c” es la concentración del material absorbente de luz. Pero como se mencionó anteriormente, utilizaremos el $-\log$ de la T, es decir la densidad óptica o absorbancia, esta fórmula quedaría como:

$$(\text{Absorbancia}) -\log T = klc$$

La ley de Lambert también llega a ser aplicada dentro de estos análisis, puesto que consiste en agregar a los criterios de la ley de Beer, la distancia que recorre la luz en dicha sustancia, la cual puede resultar en una absorbancia diferente, incluso dentro de una misma muestra, por lo que las celdas a utilizar para el análisis, deben de ser del mismo tamaño y material (Softley, 1994).

2.4.1.3. Métodos utilizados para la determinación de la concentración por medio de la espectrofotometría

Una vez que se conoce la absorbancia y la concentración de cada estándar, la longitud de onda será la misma para el análisis y así se podrá analizar una sustancia de concentración desconocida por medio de su absorbancia. Para esto se consideran tres métodos (Fritz y Schenk, 1979).

El primer método es conocido como “estándar cerrado”, para esto necesitamos las absorbancias de los estándares y de la sustancia de concentración desconocida, utilizando el estándar que tenga la absorbancia mas cercana a la sustancia a analizar (Fritz y Schenk, 1979).

Utilizando la formula de la ley de Beer, obtenemos las siguientes ecuaciones:

$$\text{Absorbancia (A)}_{\text{desconocida}} = k \cdot l \cdot c_{\text{desconocida}}$$

$$\text{Absorbancia (A)}_{\text{estándar}} = k \cdot l \cdot c_{\text{estándar}}$$

Ya que el estándar y la desconocida son las mismas sustancias, “k” será igual en ambas ecuaciones, por lo que pasaría lo mismo con “l” ya que la celdas de lectura poseen las mismas dimensiones. Al dividir ambas ecuaciones obtenemos:

$$A_{\text{desconocida}} / A_{\text{estándar}} = C_{\text{desconocida}} / C_{\text{estándar}}$$

Despejando la ecuación para la concentración desconocida:

$$C_{\text{desconocida}} = C_{\text{estándar}} \times (A_{\text{desconocida}} / A_{\text{estándar}})$$

Así al sustituir los valores de concentración del estándar y las absorbancias podremos conocer la concentración desconocida (Fritz y Schenk, 1979).

El segundo método es conocido como la curva del estándar y es por medio de un plano en el que sustituimos en el eje de las “X” la absorbancia de los estándares y la concentración de estos en el eje de las “Y”, trazando así una línea que nos permitirá conocer la concentración de una sustancia, al buscar la coordenada que coincida con la absorbancia y la línea trazada, como se muestra en la Figura 1.

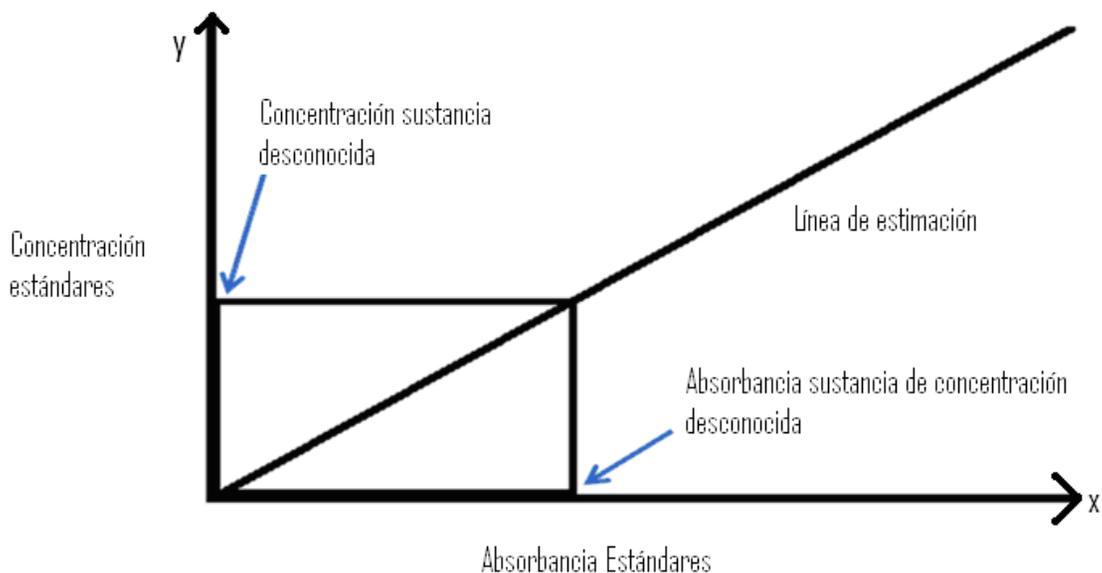


Figura 1. Método de curva del estándar.

En el tercer método también es necesario generar una curva con estándares, pero por medio de una regresión lineal, siendo así un método altamente deseable, ya que nos permite confiar en los límites de la estimación para la predicción de la concentración de una sustancia (Fritz y Schenk, 1979).

2.4.1.4. Factores a considerar que pueden alterar los análisis de espectrofotometría

Entre los factores que pueden alterar los análisis de espectrofotometría sobresale la concentración del constituyente es decir se debe asegurar que se encuentre dentro de un intervalo de concentración óptima para poder aplicar la ley de Beer (Softley, 1994).

La concentración del reactivo no debe exceder la necesaria para evitar saturar la reacción (Fritz y Schenk, 1979).

La estabilidad del color debe ser estudiada puesto que algunas veces con el paso del tiempo es inestable (Fritz y Schenk, 1979, Softley, 1994).

La temperatura de las muestras puede afectar la lectura, por lo que las muestras calientes pueden altera el color o la reacción (Barriel, 1999, Softley, 1994), por lo que, algunas técnicas aconsejan dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente para su lectura con espectrofotometría (Hill y Anderson 1958; Titgmeyer *et al.*, 2001).

Las interferencias iónicas se presentan cuando cationes o aniones interactúan con el reactivo y eviten la formación del compuesto a estudiar y por último, existe la naturaleza del solvente, por lo que es importante el uso de blancos, esto es: uso del reactivo sin muestra para corregir lecturas (Fritz y Schenk, 1979; Barriel, 1999).

2.4.1.5. Componentes básicos de un espectrofotómetro

La fuente de luz generalmente emite un tipo continuo con un amplio rango de longitud de onda, por lo que es necesaria la emisión de luz visible y ultravioleta siendo de 200 a 750 nm. La lámpara de filamento tungsteno es comúnmente usada en la región visible y la lámpara de descarga de deuterio en la región UV (Softley, 1994).

Para seleccionar la longitud de onda a utilizar proveniente de la fuente de luz, es necesario un monocromador, la selección puede ser por medio de la banda de paso (Fritz y Schenk, 1979, Softley, 1994). Las partes del monocromador son: abertura de entrada, lente o espejo que produce que la luz viaje en rayos paralelos, sitio de dispersión que selecciona la luz en sus diferentes longitudes de onda, espejo o lente de enfoque y abertura de salida (Softley, 1994). El sitio de dispersión usualmente es un prisma o una parrilla de difracción, esta última se compone de una superficie que contiene paneles paralelos con una longitud de onda específica, la luz calienta la parrilla y es difractada en diferentes longitudes de onda que pueden ser seleccionadas. Las aberturas ajustan la banda de paso espectral del monocromador (Softley, 1994).

La celda objetivo puede variar en tamaño y forma dependiendo del espectrofotómetro. Las celdas de cristal pueden ser utilizadas en el rango visible, pero las de cuarzo y sílice son necesarias para el rango de UV, ya que el cristal de boro silicato puede absorber la radiación de longitudes de onda pequeñas (Barriel, 1999; Softley, 1994).

Un fototubo de vacío funciona como el típico detector. Con cátodo de plata u óxido de plata niquelada con cesio y un ánodo son introducidos en un tubo de vidrio al vacío. Donde el ánodo se mantiene a un voltaje relativamente positivo con respecto al cátodo. Cuando los fotones de luz golpean al cátodo, los electrones son ionizados lejos del cesio y golpean el ánodo, produciendo una corriente, ésta puede ser ampliada y convertida en una forma útil de lectura (Fritz y Schenk, 1979). Los componentes básicos de un espectrofotómetro se muestran en la Figura 2.

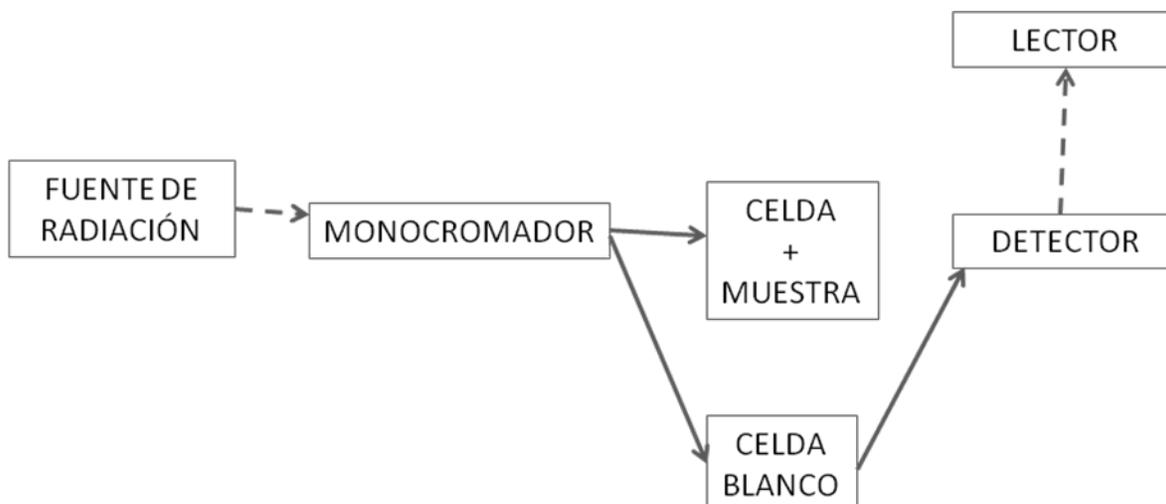


Figura 2. Componentes básicos de un espectrofotómetro.
(Adaptado de Fritz y Schenk, 1979).

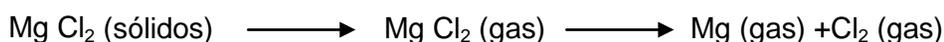
2.4.2. Espectrofotometría de emisión de flama y absorción atómica

La Espectrofotometría o espectrofotometría de absorción atómica (EAA) y de emisión de flama (EEF) son técnicas de análisis para determinar la concentración de elementos metálicos. Siendo considerada la EAA con un mayor grado de precisión (Yiakoulaki *et al.*, 1997; Kozloski *et al.*, 1998), sensibilidad (Cavaliere *et al.*, 2007) incluso a concentraciones de 0.5 mg/g de Cromo (Yiakoulaki *et al.*, 1997).

2.4.2.1. Espectrofotometría de emisión de flama

La emisión de flama consiste en medir la intensidad de la radiación de los átomos excitados a diferencia de la absorción atómica que mide la absorción de la luz por los átomos libres (Haswell, 1991).

La EEF funciona de modo en que la muestra es rociada sobre una flama, ocasionando que el solvente se evapore, dejando partículas solidas en el aire, las cuales se encontraban disueltas en el solvente, posteriormente estas partículas solidas son convertidas en vapor y separadas en átomos gaseosos (Softley, 1994; Haswell, 1991).



El calor de la flama excita los átomos en forma de gas, al retornar a un estado sin excitación los electrones emiten un fotón de luz visible o UV (Haswell, 1991).



Cuando el calor y la evaporación de la muestra son constantes, la luz emitida por los átomos será directamente proporcional a su concentración en la muestra. Por lo que la luz generada en el análisis del mineral presenta una longitud de onda específica, donde un monocromador selecciona la luz que llega a este, y por medio de estándares se determinará la concentración en las muestras (Haswell, 1991).

2.4.2.2. Interferencias en el análisis con emisión de flama

Se ha encontrado que la intensidad de la luz emitida no presenta un comportamiento lineal con respecto a la concentración de la muestra por lo que los análisis por medio de la emisión de flama, utilizan regresiones poligonales o cuadráticas para encontrar la ecuación apropiada de acuerdo a los estándares (Fritz y Schenk, 1979, Haswell, 1991). Esto puede deberse a que la energía producida por un átomo puede absorberse por otro del mismo elemento, disminuyendo la intensidad de luz emitida, incluso las interferencias producidas por luz proveniente de átomos de otros elementos que se encuentren en la muestra con una línea espectral muy cercana a la del mineral analizado, por lo que es importante usar soluciones blanco para corregir las lecturas, aun con el uso de un monocromador (Haswell, 1991).

Las interferencias de tipo iónico, como su nombre lo indica, es la ionización de los átomos, por lo que la luz emitida en su longitud de onda deseada disminuye. El uso de sales fácilmente ionizadas puede solucionar esta interferencia, pero un exceso de electrones de esta sal revierte el equilibrio en el elemento de interés, por lo que varios de estos átomos son ionizados (Fritz y Schenk, 1979, Haswell, 1991).

Los problemas en las condiciones de la flama producen interferencias en el número de átomos en estado excitado (Williams *et al.*, 1962). Esto puede ser corregido con el uso de estándares internos adicionados en una cantidad conocida a todas las muestras, este debe tener una línea espectral cercana al mineral a analizar. Si la intensidad en la emisión del estándar interno cambia, se podrá ajustar los valores de intensidad del elemento de interés (Fritz y Schenk, 1979).

La formación de sales u óxidos en la muestra producen interferencias de tipo químico, ya que ocasiona que algunos átomos no puedan liberarse (Williams *et al.*, 1962).

2.4.2.3. Espectrofotometría de absorción atómica

La EAA a diferencia de la EEF necesita una fuente de luz que emita una línea espectral igual a la que va a analizar y en donde los átomos libres absorban esta luz. Donde se aplica la ley de Beer, debido a que la absorción de luz es proporcional a la concentración del elemento. La EAA es menos susceptible a las interferencias que se encuentran en la emisión de flama, con excepción de las interferencias químicas que afectan ambos tipos de Espectrofotometría (Yiakoulaki *et al.*, 1997; Kozloski *et al.*, 1998).

La fuente de luz en la absorción atómica es conocida como lámpara de cátodo hueco, la cual contiene un gas noble en su interior como neón o argón, por su parte el cátodo esta hecho del elemento a analizar. Al aplicar voltaje, el gas es ionizado, estos iones golpean al cátodo (Fritz y Schenk, 1979), ocasionando así la liberación de átomos del cátodo que interactúan con los del gas, ocasionando su excitación, al regresar a un estado normal, los átomos despiden una luz con la longitud de onda deseada (Haswell 1991).

2.4.2.4 Partes de un espectrofotómetro de absorción atómica

La luz emitida por la lámpara de cátodo hueco es controlada por un detector el cual distingue la luz que proviene de los átomos libres en la flama. De esta forma se evita que los valores de absorbancia sean menores de lo que son realmente (Haswell, 1991; Barriel, 1999). El control puede ser por un corte manual de la luz o alternando la corriente de la fuente de luz y poniendo al detector en la misma frecuencia, en cualquiera de estos, la emisión constante de luz por los átomos libres en la flama no es afectada por el detector (Haswell, 1991).

Los aparatos actuales utilizan cámara de pre mezcla, el cual junta el oxidante y la muestra antes de entrar a la flama, logrando una flama más estable y el consumo total. El nebulizador se encarga de convertir la muestra en una fina aspersion previa a la combustión (Haswell, 1991). El monocromador y detector utilizado en la absorción atómica son en principio iguales a los utilizados en espectrofotometría, Estos componentes se muestran en la Figura 3.

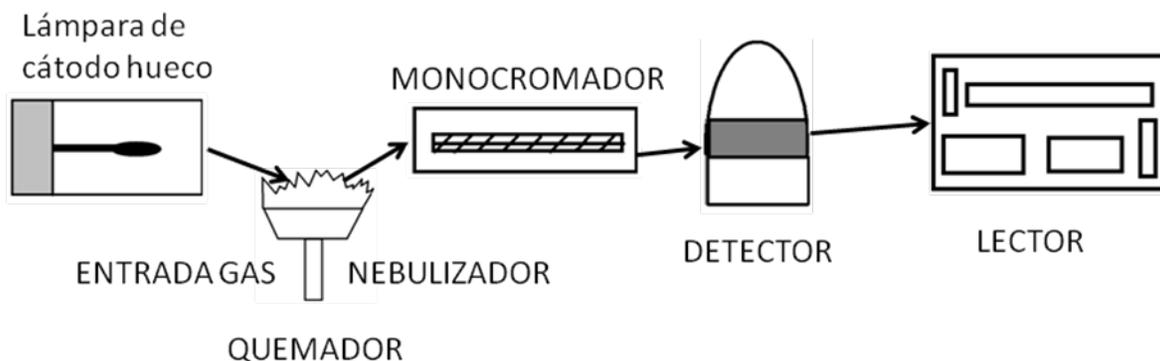


Figura 3. Componentes básicos del espectrofotómetro de absorción (Fritz y Schenk, 1979; Haswell, 1991).

2.5. Técnicas utilizadas para la determinación de Óxido de Cromo (Cr_2O_3)

Las diferentes de técnicas para el análisis de concentración del Cr_2O_3 varían en composición de los disolventes para la suspensión, así como en la longitud de onda utilizada en el análisis, por lo que a continuación se resumen las diferentes técnicas reportadas.

La técnica de espectrofotometría VIS propuesta por Hill FW y Anderson DL, (1958) consiste en una pre-digestión de 1.5 g de muestra con ácido nítrico concentrado ya sea una noche antes para facilitar la digestión, aunque alguna vez este paso no llega a ser necesario, posteriormente se realiza la digestión por medio de un reactivo de molibdato de sodio (10 g por cada 500 ml de solución), 30% de agua destilada, 30% de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y 40% de ácido perclórico (HClO_4) al 70%, este paso se lleva a cabo por medio de la ebullición del reactivo con la muestra que contiene el Cr_2O_3 , hasta obtener un color amarillo, anaranjado o rojo dependiendo de la concentración de cromo. La densidad óptica es analizada a 430 nm en un espectrofotómetro. La curva obtenida para el estándar, es por medio de alícuotas de una solución obtenida a partir de 0.5 g de óxido de cromo puro.

Otra técnica similar, propuesta por Fenton TW y Fenton M., (1979) consiste en incinerar la muestra a 450°C antes de la suspensión, en seguida se utiliza una solución similar a la técnica de Hill y Anderson (1958) a 200°C , posteriormente es aforada a 200 ml de volumen y centrifugada a 700 g por 5 minutos, obteniéndose 5 ml para su lectura a 440 nm. La digestión de la muestra oxida el Cr_2O_3 en CrO_3 , el cual dentro de la solución forma ácido crómico (H_2O y H_2CrO), posteriormente se polimeriza por la pérdida de agua del

ácido dicrómico, ácido tricromico y en polímeros mayores. Dentro de dicho procedimiento se observa el efecto causado por el H_2SO_4 de disminución en la densidad óptica en 0.010 unidades (U) por mililitro (ml), con el HClO_4 el decremento fue de 0.001 U/ml. Esto puede ser debido por el efecto deshidratante del H_2SO_4 causando un equilibrio en la mayoría de los polímeros que poseen una absorción similar a la del ion de dicromato. Debido a esta condición de equilibrio, es importante mantener la concentración de ácido lo más constante posible (Fenton y Fenton, 1979). Esta técnica se basa en el principio de la oxidación del Cr_2O_3 para formar dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_4^{2-}$) por medio de la oxidación presente durante la ebullición, con un exceso de persulfato el cual es eliminado por medio del calor (Cavalieri *et al.*, 2007). Utilizando el principio de que el Cr^{3+} y el Cr^{2+} de color natural verde y azul respectivamente, cambian hacia amarillo y naranja al oxidarse en cromato y dicromato (Barriel, 1999).

Dentro de esta técnica, la solución de digestión, difiere en su composición con respecto a la de Hill FW y Anderson DL., 1958, en donde se utiliza 70% de ácido sulfúrico concentrado y 30 % de ácido perclórico al 70%.

En otros estudios, que utilizan esta técnica, la densidad óptica es determinada a diferentes longitudes de onda, como a 450 nm (Cavalieri *et al.*, 2007) o incluso a 415 nm (Sandoval *et al.*, 2001).

Czarnocki *et al.* (1961) utilizan diferentes cantidades de muestra dependiendo de su tipo, por ejemplo: 1 g para heces y 2 g para alimento, la incineración es a 450°C , con una densidad óptica de 350 nm, a su vez el tiempo de digestión es de 15 minutos, posteriormente del primer cambio de color verde a naranja/amarillo, cabe mencionar que durante su estudio no se encontró efecto alguno sobre la D.O. al utilizar H_2SO_4 combinado con HClO_4 . Por otra parte Kozloski *et al.* (1998) utilizaron esta técnica con la variación de utilizar 2 g de muestra independientemente si es alimento o heces.

La técnica de Espectrofotometría propuesta por Williams *et al.* (1962) donde las muestras son incineradas a 600°C por 1.5 h y digeridas por medio de una solución de ácido fosfórico, sulfato de manganeso y bromato de potasio, al mantener en ebullición la muestra obtuvieron un color purpura. La ausencia del HClO_4 es justificada, debido a que satura las soluciones de perclorato de potasio, que puede afectar la generación adecuada de la atomización, ocasionado errores, se recomienda adicionar calcio (Ca) en cantidad de 4000 partes por millón (ppm) a la muestra para evitar posibles interferencias.

Robinson *et al.* (1987) realizaron una modificación a la técnica utilizando 50 mg de muestra de Cr Mordiente y 500 mg de heces para su análisis, adicionándole 156 ml de ácido nítrico en un baño de agua a 20 o 30°C aumentando la temperatura gradualmente hasta llegar a los 75°C por una hora, posteriormente se agregan 50 ml de agua destilada dejándose enfriar a temperatura ambiente, se prosigue a centrifugar a 1000 g por 10 minutos y el sobrenadante es utilizado para la EAA.

Por otra parte Fadel *et al.* (1987), proponen utilizar 0.67g de muestra de contenido ruminal o heces en 20 ml de solución HNO₃ 4M (molar) por un tiempo de cuatro horas a temperatura ambiente, posteriormente a 75°C por 12 horas. Permitiendo sedimentarse a temperatura ambiente, se utiliza el sobrenadante para el análisis de Cr por espectrofotometría de absorción atómica.

Otra modificación es la de Yiakoulaki *et al.* (1997) quienes propusieron el uso de una fusión alcalina. Con 0.5 g de muestra incinerada a 560°C por tres horas, posteriormente se agrega 2 g de Na₂O₂, el cual debe estar perfectamente mezclado con la muestra, la cual es calentada y se obtiene un color amarillo brillante, en caso de no obtenerlo se agrega HCl, para su posterior análisis con EAA.

2.5.1. Interferencias

Las interferencias encontradas en el análisis de Cr₂O₃ por medio de esas técnicas han sido la formación de silicatos insolubles en ácido, formados durante la incineración de las muestras que pueden absorber el Cr (Mir, 1989). La volatilización de compuestos como clorhidrato de cromo, por medio del uso de ácido perclórico (Mir, 1989) aunque Fenton y Fenton (1979), encontraron un menor efecto causado por el HClO₄ que con el H₂SO₄ al disminuir la densidad óptica de las muestras analizadas.

Algunas partículas de la muestra tienden a flotar en el ácido utilizado en la digestión, por lo que pueden adherirse a las paredes de los crisoles, y existir una pérdida de contacto de estas partículas de la muestra y el ácido, resultando en una suspensión incompleta y una recuperación variable del Cr (Mir, 1989).

2.5.2. Recuperaciones

En un experimento realizado por Mir *et al.*, (1989) el porcentaje de recuperación de Cr en heces frescas (HFF) fue mayor que el obtenido por las muestras deshidratadas, de las

cuales la deshidratación con microondas resulta mejor que la de aire forzado ($P < 0.05$). En ambos casos las recuperaciones obtenidas fueron menores al 100%

Recuperaciones de Cr en forma Mordiente por medio de diferentes métodos de deshidratación de la muestra dieron menores recuperaciones por medio del horno de aire forzado con un 68.3%, con tratamiento de Tween 80 (Mir *et al.*, 1989).

2.6. Técnicas utilizadas para la determinación de TiO_2

La técnica utilizada para el análisis de TiO_2 a través de la espectrofotometría. (Leone, 1973), recomienda incinerar la muestra a $850\text{ }^\circ\text{C}$, al enfriarse se añade 1.5 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) y 10 ml de H_2SO_4 , calentándolos hasta la ebullición, dejándolos enfriar y posteriormente se agrega 30 ml de H_2O , siendo aforado a 100 ml con agua destilada y obteniéndose 3ml para su análisis agregándose 0.2 ml de H_2O_2 leyéndose a 408 nm.

Por otra parte Jagger *et al.* (1991) modificaron esta técnica al digerir por 30 minutos 0.5 g de muestra utilizando 20 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 42% y el uso de catalizadores Kjeltabs, aforándolas a 100 ml con agua destilada y filtrándolas. Obtuvieron una alícuota de 5 ml adicionándole 0.2 ml de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 30% y leyeron también a 408 nm.

En la técnica propuesta por Short *et al.* (1996) utilizaron una incineración a $600\text{ }^\circ\text{C}$ por 13 horas, seguida por una suspensión con ácido sulfúrico concentrado, mas la adición de 20 ml de H_2O_2 al 30% leyeron a 400 nm. Titgmeyer *et al.* (2001), modifica la técnica de Short *et al.* (1996) al reducir el volumen a 10 ml de H_2O_2 a 30%.

La técnica propuesta por Myers *et al.* (2004) utilizaron una digestión húmeda por medio de 13 ml de H_2SO_4 a $420\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas, con la adición de un catalizador con 3.5 g de sulfato de potasio (K_2SO_4) y 0.4 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$), posteriormente agregaron 10 ml de H_2O_2 a 30%, a diferencia de otras técnicas, se recomendó el uso de matraces gravimétricos de 100 g y papel filtro Whatman del No. 541, leyeron a una absorbancia de 410 nm, sin embargo existe la dificultad de hervir H_2SO_4 por mas de 30 minutos en alturas superiores a los 2, 200 msnm (Myers *et al.*, 2004) .

En peces se encuentra la técnica propuesta por Richter *et al.* (2003) utilizando aproximadamente de 30 a 40 mg de muestra de alimento y heces, digeridas con 10 ml de H_2SO_4 al 96% y 1.5 g de catalizador ($K_2SO_4 + CuSO_4 + 5H_2O$) a $400\text{ }^\circ\text{C}$ por 4 h y transferidas a vasos volumétricos de 25 ml y llevados al volumen con agua destilada, dejándose enfriar por 12 h, posteriormente con una alícuota de 1.0 ml y se adiciona 0.1 ml de H_2O_2 a

35%, dejándose reposar por 1 h y leídas a 405 nm. Por medio de esta técnica encontraron recuperaciones del 90% en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

El análisis de TiO_2 por medio de espectrofotometría de absorción atómica como marcador de la digestibilidad no ha sido citado hasta el momento.

Las diferentes técnicas mencionadas, utilizaron una variedad en disolventes, los cuales pueden influir al disminuir la absorbancia (efecto hipocrómico) obtenida del compuesto analizado como lo mencionan Fenton y Fenton, (1979) y Williams *et al.* (1962) o incluso aumentarla (efecto hiperocrómico) ya que pueden unirse al conjunto de átomos a analizar (cromóforos) grupos ácidos o básicos (auxocromos) y tender a intensificar la longitud de onda de los cromóforos (Higson, 2007).

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Evaluar el Cr_2O_3 y TiO_2 como marcadores de la digestibilidad.

3.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar *in vitro* la precisión de los procedimientos de espectrofotometría (UV/VIS *versus* EAA) para cuantificar la recuperación de los marcadores Cr_2O_3 y TiO_2 solos y en mezcla, en muestras de alimento ofrecido, contenido duodenal y heces de ovinos y bovinos.
2. Determinar la recuperación de Cr_2O_3 , TiO_2 solos y en mezcla mediante una prueba de digestibilidad *in vivo* con ovinos.
3. Comparar las estimaciones obtenidas de digestibilidad de materia seca (DMS), materia orgánica (DMO), fibra detergente neutro (DFDN) y nitrógeno total (N) con CTH y los marcadores Cr_2O_3 y TiO_2 solos y en mezcla.

4. Hipótesis

1. La recuperación de los marcadores TiO_2 , Cr_2O_3 y su mezcla ($\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$, $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$), es distinta según la técnica de análisis utilizada (espectrofotometría UV/VIS y EAA) para su cuantificación en muestras de alimento, contenido duodenal y heces de ovinos y bovinos.
2. La recuperación de los marcadores TiO_2 , Cr_2O_3 y su mezcla ($\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$, $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$) es distinta según el nivel de marcador utilizado y la técnica de análisis (espectrofotometría y absorción atómica) usada para su cuantificación en muestras de alimento, contenido duodenal y heces de bovinos y ovinos.
3. En estudios de digestibilidad del alimento en ovinos el uso de TiO_2 sólo o en su mezcla con Cr_2O_3 permite predicciones de digestibilidad similares a las obtenidas por colección total de heces o a la utilización de Cr_2O_3 como marcador.

5. Material y Métodos

En el presente estudio se realizaron dos experimentos, que a continuación se describen.

5. 1. Experimento 1. Recuperación *in vitro* de Cr₂O₃, TiO₂ y sus mezclas

Animales y toma de muestras

Se utilizaron seis ovinos machos (PV 35 ± 4.25 Kg) y seis bovinos machos (PV 190 ± 120 Kg) alimentados con heno de avena 28% de la ración y concentrado comercial 72% de la ración en base seca. Los animales fueron habilitados con cánulas en duodeno proximal (Zinn y Plascencia, 1993). El contenido duodenal se colectó de 0 a 5 (8:00 a 13:00) y 6 a 11 (14:00 a 19:00) horas post ingestión, por 5 días. Diariamente se colectaron muestras de heces directamente del recto, por cinco días. Las muestras de heces se mezclaron para obtener una muestra compuesta de cada tipo de animal. Lo mismo se realizó con el contenido duodenal y se conservaron en congelación a -20°C hasta que finalizó el periodo de muestreo. Posteriormente se deshidrataron en recipientes de vidrio en una estufa de aire forzado (Lindbergh Blue M) a 50°C 48h. En el caso del contenido duodenal y heces se usaron charolas de aluminio. Una vez secas las muestras se molieron en un molino de café (Braun) a un tamaño de partícula de 1mm para heces y contenido duodenal. Para alimento se utilizó un molino de granos (Arthur Thomas) con una criba de 1mm.

Análisis de las muestras

En un vidrio de reloj se pesaron por cuadruplicado los diferentes niveles de Cr₂O₃ y TiO₂ y su mezcla, siendo para heces: 0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 %, para alimento y contenido duodenal: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 %, con pesos de 1.5 g de muestra para la técnica propuesta por Hill y Anderson, (1958) y 0.5g para la técnica propuesta por Titgemeyer *et al.* (2001) en una balanza analítica (Sartorius 3L 120) en vasos de precipitado de 80 ml, una vez adicionados los marcadores se homogenizaron por agitación y se cuantificaron por medio de la técnicas mencionadas y un espectrofotómetro VIS (Thermo Fisher Scientific modelo Genesys 10 Vis), a una longitud de onda de 430 nm para Cr₂O₃ y 410 nm para TiO₂, y un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3110) con una lámpara de Cr y Ti (Perkin Elmer). La curva de calibración analítica fue por medio del uso de soluciones

estándar con cantidades conocidas de cada marcador, Cr_2O_3 (0.05, 0.1, 0.15, 0.5 mg/ml) siendo la misma para VIS y EAA, en el caso de TiO_2 (0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05 y 0.2 mg/ml) para VIS y (10, 20 y 40 ppm) de Ti para EAA. Las mezclas $\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$ y $\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$ difieren en que los dos están mezclados pero solo se suspende y analiza uno de los compuestos ya sea Cr_2O_3 o TiO_2 por medio de las técnicas ya mencionadas.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de los porcentajes de recuperación de los marcadores, de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 (técnica: VIS y EAA) x 4 (marcador: Cr_2O_3 , TiO_2 , $\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$, $\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$) x nivel del marcador (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 para heces y 0, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6% para alimento y contenido duodenal) en cada tipo de muestra: alimento y contenido duodenal y heces de bovino o contenido duodenal y heces de ovino. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$) (Tukey, 1949).

Para efectos por tipo de muestra, técnica y niveles del marcador se utilizaron polinomios ortogonales (Cochran y Cox, 1957), en ambos se utilizó el procedimiento GLM del software estadístico SAS (1999).

5.2. Experimento 2. Evaluación *in vivo* de los marcadores como marcadores de la digestibilidad aparente en ovinos

Animales y dietas

Se utilizaron seis ovinos machos de la raza Pelibuey ($\text{PV } 40.75 \pm 5.83 \text{ kg}$), para evaluar la recuperación de los marcadores: óxido de cromo (Cr_2O_3) y dióxido de titanio (TiO_2) solos y de forma combinada. Los ovinos fueron alimentados con 72% grano de sorgo, 6.18% alfalfa heno, 12.35% de heno de avena, 1% de urea, 5.46% de melaza de caña, 1.15% de Calcio al 38%, 0.21% de óxido de Magnesio, 0.5% de bicarbonato de sodio, 0.2% de fosfato dicálcico, 0.5% de sal común y 0.05% premezcla mineral (Fosforysal). A la que se adicionó 0.4% del marcador (Cr_2O_3 , TiO_2 y su mezcla). La ingestión de alimento se restringió al 2.2 % del peso vivo. Los animales se alojaron en jaulas metabólicas, con un arnés individual para recolectar las heces. La alimentación fue en porciones iguales en

intervalos de 12 horas. Antes de comenzar el experimento se realizó un periodo de adaptación a la dieta por 20 días y entre periodos 15 días, con 5 días de recolección de muestras. Las muestras de heces se colectaron de los arneses en los días 21 al 25 a las 9:00 h, se pesó y separó un 10% del total, mezclándose para obtener una muestra compuesta por animal y periodo, conservándose en congelación (-20°C) para su posterior análisis en laboratorio.

Análisis de laboratorio

Las muestras de alimento y heces fueron deshidratadas en recipientes de plástico en una estufa de aire forzado (Lindbergh Blue M) a 50°C 48h. Una vez secas las muestras se molieron en un molino de café (Braun) a un tamaño de partícula de 1mm para alimento y heces. La composición química del alimento y heces se determinó; MS, MO y N, (AOAC, 1991), la concentración de FDN (Van Soest *et al.*, 1991). Para la determinación de óxido de cromo se utilizó la técnica de Hill y Anderson, (1958), mientras que el dióxido de titanio fue determinado con la técnica utilizada por Titgemeyer *et al.* (2001). Analizados por medio del espectrofotómetro VIS (Thermo Fisher Scientific modelo Genesys 10 Vis) o espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3110) con una lámparas de Cr y Ti (Perkin Elmer). La curva de calibración analítica fue por medio del uso de soluciones estándar con las cantidades mencionadas en el experimento 1.

Estimación de la digestibilidad aparente

Para la estimación de la digestibilidad aparente se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Utilizando la CTH:

$$\text{Digestibilidad aparente} = 100 * [(\text{NutsIng} - \text{Nutshcs}) / \text{NutsIng}]$$

Donde: NutsIng son los nutrientes en ingredientes (g/d) y Nutshcs son los nutrientes en heces (g/d).

Utilizando marcadores:

Producción de heces MS g/d = (marcador consumido g/d) / (marcador en heces g/d)

Para la estimación de la digestibilidad de componentes (MS, MO, FDN)

Digestibilidad X = 100* [(Consumo de X g/d – Excreción de X g/d)/ Consumo de X g/d]

Donde X= MO, FDN, N, etc.

Donde el consumo y excreción están en gramos por día y el Coeficiente de digestibilidad en porcentaje.

Análisis estadístico

Los valores de digestibilidad aparente del tracto total en cada tratamiento (MS, MO, FDN y N) fueron sometidos a un análisis de varianza para un diseño experimental de cuadrado latino con ajuste por residuales ocupando 3 tratamientos que se repartieron e 6 animales en forma distinta en 3 periodos, de acuerdo a como se presentan en el cuadro 2. (Cochran y Cox, 1957) se utilizó el procedimiento GLM del *software* estadístico SAS (1999).

Para efectos de marcador y técnica en los valores de digestibilidad aparente del tracto total en cada uno (MS, MO, N y FDN) y excreción de N con un diseño totalmente al azar; siendo ahora 11 tratamientos (CTH1, CTH2, CTH3, Cr₂O₃ VIS, Cr₂O₃ + TiO₂ VIS, Cr₂O₃ EAA, Cr₂O₃ + TiO₂ EAA, TiO₂ VIS, TiO₂ + Cr₂O₃ VIS, TiO₂ EAA, TiO₂ + Cr₂O₃ EAA) con 6 repeticiones por cada uno (Kuehl, 2001) por medio del *software* estadístico SPSS 15.0 (2006). Siendo CTH para cada tratamiento y las mezclas Cr₂O₃+ TiO₂ y TiO₂+ Cr₂O₃ difieren en que los dos están mezclados pero solo se suspende y analiza uno de los compuestos ya sea Cr₂O₃ o TiO₂ por medio de VIS o EAA.

Cuadro 2. Distribución de tratamientos en ovinos alimentados con dietas basadas en sorgo, adicionando 0.4 % de Cr₂O₃ (T1), 0.4% de TiO₂ (T2) y 0.4% de Cr₂O₃ + 0.4% de TiO₂ (T3), utilizando un cuadrado latino de ajuste por residuales.

Periodo	Número de animal					
	1	2	3	4	5	6
1	T1	T2	T3	T1	T2	T3
2	T2	T3	T1	T3	T1	T2
3	T3	T1	T2	T2	T3	T1

Modelo estadístico; cuadrado latino

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + \epsilon_{ijk}$$

Y = variable de respuesta

i = subíndice para identificar periodos i = 1, 2 y 3.

j = subíndice para identificar animales j = 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

k = Subíndice para identificar tratamientos k = 1, 2 y 3

Donde:

Y_{ijk} = Efecto causado por la i-ésimo periodo con el j-ésimo animal y el k-ésimo tratamiento.

μ = Media general

α_i = Efecto de la i-ésimo periodo

β_j = Efecto del j-ésimo animal

τ_k = de la i-ésimo tratamiento

ϵ_{ijk} = Error aleatorio

Para las comparaciones de medias de tratamiento se utilizó la prueba de Tukey (Tukey, 1949).

6. Resultados y discusión

6.1. Experimento 1. Recuperación in Vitro de Cr_2O_3 , TiO_2 y sus mezclas

6.1.1. Recuperación de los marcadores en la muestra de alimento

Como se observa en el Cuadro 3 con respecto al porcentaje de recuperación se obtuvo una interacción entre el nivel de marcador, técnica y tipo de marcador ($P < 0.001$). Los valores más cercanos a 100% correspondieron a $\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$ (95%) analizando Cr por EAA, y Ti (108%) por EAA con un nivel de 1.2%, los cuales fueron similares a $\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$ con los niveles 1.2 y 1.6 (96 y 83% respectivamente) analizando Ti, por EAA. En un estudio realizado por Carfciofi *et al.* (2007) en muestras de alimento de dieta comercial de perro adulto en mantenimiento, registraron una recuperación del 99% para Cr_2O_3 cuando utilizaron VIS, en comparación al 103% de recuperación utilizando EEF, en una concentración de 3.5 g de Cr_2O_3 por kg de alimento. Por otra parte Kozloski *et al.* (1998) estudiaron estos marcadores en una dieta compuesta por heno de zacate italiano, grano de maíz, harina de soya y sales minerales, obtuvieron recuperaciones de 125% para VIS y 100% con EAA, bajo una concentración de 1.2 mg de Cr_2O_3 /g de MS en heces de bovinos productores de leche.

En el presente estudio, para Cr_2O_3 con niveles inferiores a 1.6 % la recuperación de los marcadores indicados fue menor a 83 %. La recuperación mas cercana a 100% para Cr_2O_3 fue con el nivel de 1.6% por EAA (113%). La recuperación <100 % obtenida al utilizar VIS es similar a la que obtuvieron Mir *et al.* (1989) quienes obtuvieron un porcentaje de recuperación entre 68.3 y 67.9% cuando utilizaron un nivel de concentración del marcador de 5 y 10 g de Cr mordiente con la presencia del agente humectante Tween 80, adicionado en 200 g de heces de bovinos. Esos investigadores obtuvieron recuperaciones del 83 y 82.6% en ausencia del agente humectante siendo analizadas las muestras por EAA.

Cuadro 3. Recuperación (%) de Cr₂O₃ y TiO₂ en el alimento con cuatro niveles de marcador analizado por dos técnicas de espectrofotometría.

NIVEL *	Cr ₂ O ₃		Cr ₂ O ₃ + TiO ₂ **		TiO ₂		TiO ₂ + Cr ₂ O ₃ ***		EEM ³
	VIS ¹	EAA ²	VIS	EAA	VIS	EAA	VIS	EAA	
0.4%	72 ^{lmn}	83 ^{kl}	67 ^{mno}	69 ^{mno}	148 ^{bc}	236 ^b	144 ^{bc}	251 ^a	13.29
0.8%	60 ^o	80 ^{lm}	63 ^{no}	66 ^{mno}	122 ^{fgh}	120 ^{ghi}	140 ^{bcde}	149 ^b	6.48
1.2%	66 ^{mno}	73 ^{lmn}	55 ^o	62 ^{no}	126 ^{efgh}	108 ^{ij}	128 ^{efg}	96 ^{jk}	5.16
1.6%	63 ^{no}	113 ^{hi}	58 ^o	95 ^{jk}	123 ^{fgh}	79 ^{lm}	134 ^{cdef}	83 ^{kl}	4.91
EEM ⁴	1.28	4.42	1.33	3.74	3.07	17.25	1.75	19.09	

Interacción técnica x marcador x nivel de marcador P < 0.001
Medias con diferente literal ^{a, b, c, (...)} m, n, o son diferentes (P<0.001)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM: error estándar de la media por hileras

⁴ EEM: error estándar de la media por columnas

* Nivel: cantidad en porcentaje del marcador que se agrego a la muestra

** Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr₂O₃

*** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO₂

La sobre estimación obtenida para TiO₂ por VIS puede deberse al color de la reacción de las muestras, ya que estas presentaban un color anaranjado rojizo, mas intenso que el anaranjado esperado. De acuerdo con Muhlebach *et al.* (1970) el color de la reacción de TiO₂/H₂O₂ es anaranjado debajo de un pH ácido de 1.0 y gradualmente disipa conforme aumenta el pH hacia la región alcalina, así mismo en el presente estudio la existencia de burbujas en el análisis con VIS, incluso después de un periodo de reposo, pudo haber generado un efecto en la densidad óptica de las muestras. Para EAA existen minerales que pueden incrementar la señal de lectura del Titanio como lo son el Fe, Ni, Cu, Co y Cr como lo indica Leone, (1973), sin embargo Kavanagh *et al.* (2001), Titgemeyer *et al.* (2001), Jagger *et al.* (1991) utilizaron Cr₂O₃ y TiO₂ combinados sin interferencias en su recuperación en su análisis por VIS en estudios *in vivo*.

Como se muestra en el Cuadro 4, al analizarlo los efectos principales, el porcentaje de recuperación fue mayor para EAA *versus* VIS (P<0.05) con 110 y 98% de recuperación respectivamente, lo cual concuerda con Carciofi *et al.* (2007) (Cuadro 4).

En el análisis de efecto por tipo de marcador se registró la mayor (P<0.05) recuperación con TiO₂ y TiO₂+Cr₂O₃ respecto a Cr₂O₃ y Cr₂O₃+TiO₂ (Cuadro 3), lo cual difiere con lo encontrado por Titgemeyer *et al.* (2001) y Kavanagh *et al.* (2000), quienes obtuvieron que TiO₂ registró porcentajes de recuperación menores a Cr₂O₃ y concordando con Jagger *et*

al. (1991) quienes señalaron que TiO₂ manifestó mayor recuperación sobre Cr₂O₃, aunque en porcentajes cercanos al 100%.

Respecto al nivel del marcador, se observa que al incrementar el nivel del marcador, disminuye (efecto lineal, P < 0.01) el porcentaje de recuperación, esto es debido a que los valores obtenidos en el nivel 0.4% de TiO₂ y TiO₂+Cr₂O₃ determinados por EAA fueron los mas elevados en el presente estudio, probablemente a que en dicho nivel los minerales que puedan incrementar la lectura de Ti tuvieron una mayor efecto.

Cuadro 4. Efecto del tipo de técnica, marcador y nivel sobre la recuperación (%) del marcador en alimento (Media ± Error estándar).

%RECUPERACIÓN					
TÉCNICA	EAA ¹		VIS ²		EEM ₃
	110 ± 7.1 ^a		98 ± 4.3 ^b		4.2
MARCADOR	Cr ₂ O ₃	Cr ₂ O ₃ +TiO ₂ *	TiO ₂	TiO ₂ +Cr ₂ O ₃ **	
	76 ± 3.0 ^b	67 ± 2.2 ^b	133 ± 8.1 ^a	141 ± 8.9 ^a	4.2
NIVEL %	0.4	0.8	1.2	1.6	LINEAL
	134 ± 13.3	100 ± 6.5	93 ± 4.9	89 ± 5.2	0.0003

a. b. c Medias con diferente literal dentro de las filas son diferentes (P<0.001)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM Error estándar de la media

* Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr₂O₃

** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO₂

6.1.2. Recuperación de los marcadores en contenido duodenal de bovino

En la muestra de contenido duodenal de bovino se encontró una interacción entre el nivel del marcador, técnica y tipo de marcador (P<0.001). Las recuperaciones cercanas al 100% (Cuadro 5) correspondieron a Cr₂O₃ y Cr₂O₃+TiO₂ (97 y 95% respectivamente) determinados por EAA dentro del nivel 1.6% en forma similar al resultado obtenido en muestras de alimento. En cambio al utilizar TiO₂ a diferencia de lo que ocurrió en las muestras de alimento la recuperación cercana a 100% se obtuvo por VIS en los niveles 0.4 y 1.2% y nivel 0.4% cuando se utilizo EAA. Estos resultados difirieron de los obtenidos por Myers *et al.* (2004) quienes recuperaron 74.28% en forraje y 83.83% en heces al

utilizar solo TiO_2 como marcador; y 53.06% en heces de bovino cuando combinaron este marcador con Cr_2O_3 y lo analizaron por la técnica de Titgmeyer *et al.* (2001). Además, en el presente estudio la recuperación de $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$ cuando se utilizó VIS y EAA en el nivel 0.4% y cuando se utilizó VIS hasta el nivel 1.6% se registró una recuperación cercana al 100%.

Las recuperaciones de Cr_2O_3 y $\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$ inferiores a 77% presentes en todos los niveles al ser analizados con VIS y en los niveles 0.4 a 1.2% al ser determinados por EAA, fueron similares a los resultados obtenidos con la muestra de alimento. Estos resultados concuerdan con Mir *et al.* (1989).

Por otra parte, la recuperación de TiO_2 al ser analizado por EAA presenta valores inferiores ($P<0.05$) dentro de los niveles 0.8 a 1.6% (64 a 47%, respectivamente) en comparación con el nivel 0.4% que registró una recuperación de 100%. Los valores fueron inferiores a la recuperación de la mezcla $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$ determinada por EAA y la recuperación en los niveles 0.8 fue mayor ($P<0.05$) al nivel 1.2 y 1.6 %, que fueron los que registraron menor porcentaje de recuperación (56 y 47%) solo para TiO_2 por medio de EAA.

La recuperación de Cr_2O_3 y $\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$ en contenido duodenal de bovinos al comparar las técnicas VIS y EAA, en los niveles 0.4 y 1.2%, fue similar ($P>0.05$). Estos resultados difieren de los de Carfciofi *et al.* (2007) y Kozloski *et al.* (1998), en muestras de heces de perro y bovino respectivamente, quienes encontraron diferencia entre las técnicas. Las similitudes en principio e instrumentos dentro de los análisis con VIS y EAA son; la fuente de radiación, el medio de absorbancia o material analizado, el monocromador y el detector. La fuente en espectrofotómetros de VIS es continua y en la mayoría de los análisis la absorbancia de la solución a determinar se mide a una determinada longitud de onda, por lo tanto la fuente de radiación en EAA, generada por la liberación y excitación de los átomos en una lámpara de cátodo oculto, podría llegar a producir una línea espectral igual a la longitud de onda específica, por lo que existirían resultados similares a VIS como lo cita Hildon (1971), al utilizar un espectrofotómetro de absorción atómica para análisis de colorimetría.

Cuadro 5. Recuperación (%) de Cr₂O₃ y TiO₂ en contenido duodenal de bovino con cuatro niveles de marcador analizado por dos técnicas de espectrofotometría.

NIVEL*	Cr ₂ O ₃		Cr ₂ O ₃ + TiO ₂ **		TiO ₂		TiO ₂ + Cr ₂ O ₃ ***		EEM ³
	VIS ¹	EAA ²	VIS	EAA	VIS	EAA	VIS	EAA	
0.4%	68 ^{ghi}	77 ^{fg}	74 ^{fgh}	69 ^{ghi}	111 ^{bc}	100 ^{cde}	107 ^{cd}	110 ^{cd}	3.37
0.8%	65 ^{hij}	77 ^{fg}	50 ^l	68 ^{ghi}	113 ^{bc}	64 ^{hi}	134 ^a	93 ^e	5.04
1.2%	65 ^{hij}	67 ^{ghi}	60 ^{ijk}	66 ^{hi}	115 ^{bc}	56 ^{kl}	120 ^b	82 ^f	4.42
1.6%	66 ^{hi}	97 ^e	54 ^{kl}	95 ^e	120 ^b	47 ^l	111 ^{bc}	71 ^{gh}	4.76
EEM ⁴	0.31	3.03	2.59	3.4	0.98	5.82	3.03	4.14	

Interacción técnica x marcador x nivel de marcador P < 0.001

Medias con diferente literal ^{a, b, c, (...), j, k, l} son diferentes (P<0.001)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

²EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³EEM: error estándar de la media por hileras

⁴EEM: error estándar de la media por columnas

* Nivel: cantidad en porcentaje del marcador que se agrego a la muestra

** Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr₂O₃

*** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO₂

En contenido duodenal de bovino el análisis de efectos principales (Cuadro 6), mostró que el porcentaje de recuperación por tipo de técnica utilizada fue superior para VIS *versus* EAA (P<0.05) con 89 y 77% respectivamente (Cuadro 6), similar a lo encontrado por Kozloski *et al.* (1998).

El análisis de efecto de tipo de marcador mostró que la mayor recuperación (P<0.05) se obtuvo con TiO₂ + Cr₂O₃ y diferente a TiO₂ (P<0.05); mientras Cr₂O₃ y Cr₂O₃+TiO₂ fueron las menores recuperaciones (P<0.05).

El porcentaje de recuperación en las muestras por efecto de nivel fue similar (P>0.05) en contenido duodenal de bovino se encontraron recuperaciones cercanas al 100% en el nivel 0.4% por EAA, con TiO₂ y TiO₂+Cr₂O₃ a diferencia de la muestra de alimento, ya que pueda existir una menor concentración de minerales que incrementen la lectura de Ti (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto del tipo de técnica, marcador y nivel sobre la recuperación (%) del marcador en contenido duodenal de bovino (Media \pm Error estándar).

%RECUPERACIÓN					
TECNICA	EAA ¹		VIS ²		EEM ³
	77 \pm 2.2 ^b		89 \pm 3.6 ^a		2.1
MARCADOR	Cr ₂ O ₃	Cr ₂ O ₃ +TiO ₂ [*]	TiO ₂	TiO ₂ +Cr ₂ O ₃ ^{**}	
	72 \pm 1.9 ^c	67 \pm 1.9 ^c	91 \pm 5.3 ^b	103 \pm 3.6 ^a	2.1
NIVEL %	0.4	0.8	1.2	1.6	
	89 \pm 3.4	83 \pm 5.0	82 \pm 4.4	79 \pm 4.8	

Medias con diferente literal (a, b, c) dentro de las filas son diferentes (P<0.0001)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM Error estándar de la media

* Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr₂O₃

** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO₂

6.1.3. Recuperación de los marcadores en contenido duodenal de ovino

Como se muestra en el Cuadro 7, se encontró una interacción entre el nivel del marcador, técnica y tipo de marcador (P<0.001), con respecto a la muestra de contenido duodenal de ovino la recuperación cercana al 100% fue similar a las encontradas con alimento y contenido duodenal de bovino, y se logró utilizando Cr₂O₃ y Cr₂O₃+TiO₂ determinados por EAA, dentro del nivel 1.6%, registrando 111 y 93% respectivamente.

También de forma similar a lo que sucedió con contenido duodenal de bovino, utilizando TiO₂ analizado por VIS, en los niveles 0.4 a 1.2% las recuperaciones fueron elevadas (>100%), similares (P>0.05) a las obtenidas utilizando Cr₂O₃ determinado por EAA al nivel 1.6% (Cuadro 7). El TiO₂+Cr₂O₃ solo se recuperó en cantidad semejante a las anteriores (107%, P>0.05) en el nivel 0.4% con VIS y 1.2% con EAA, además, dentro de esta técnica en el nivel 1.6% la recuperación fue similar (99%, P>0.05) a la determinada con Cr₂O₃+TiO₂ cuando se utilizó EAA (Cuadro 6).

Los porcentajes de recuperación de TiO₂ obtenidos por EAA en los niveles 0.4 al 1.6% fueron menores a TiO₂+Cr₂O₃, por lo que posiblemente la mezcla de los marcadores pueda afectar la recuperación de TiO₂ al ser analizado por EAA, en los niveles

mencionados dentro de la muestra de contenido duodenal de ovino. De forma similar sucede en contenido duodenal de bovino con la excepción del nivel 0,4% donde no se encontró diferencias entre las técnicas y marcadores ($P>0.05$).

La comparación entre las técnicas VIS y EAA para la recuperación de Cr_2O_3 y $\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$ en el nivel 0.4 registraron concentraciones similares ($P>0.05$), mientras en contenido duodenal de bovino, los niveles 0.4, y 1.2% compartían esta similitud.

Cuadro 7. Recuperación (%) de Cr_2O_3 y TiO_2 en contenido duodenal de ovino con cuatro niveles de marcador analizado por dos técnicas de espectrofotometría.

NIVEL*	Cr_2O_3		$\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2^{**}$		TiO_2		$\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3^{***}$		EEM ³
	VIS ¹	EAA ²	VIS	EAA	VIS	EAA	VIS	EAA	
0.4%	67 ^{ijkl}	77 ^{hi}	76 ^{hij}	78 ^h	112 ^e	78 ^h	107 ^{ef}	128 ^d	3.89
0.8%	66 ^{ijkl}	77 ^h	64 ^l	78 ^h	110 ^e	46 ^m	163 ^c	127 ^d	6.89
1.2%	65 ^l	79 ^h	61 ^l	76 ^{hijk}	115 ^e	43 ^m	173 ^{bc}	111 ^e	7.28
1.6%	66 ^{kl}	111 ^e	62 ^l	93 ^g	194 ^a	51 ^m	180 ^b	99 ^{fg}	9.47
EEM ⁴	0.21	4.18	1.72	1.97	10.28	3.96	8.31	3.44	

Interacción técnica x marcador x nivel de marcador $P < 0.001$

Medias con diferente literal^{a, b, c, (...), k, l, m} son diferentes ($P<0.001$)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM: error estándar de la media por hileras

⁴ EEM: error estándar de la media por columnas

* Nivel: cantidad en porcentaje del marcador que se agrego a la muestra

** Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr_2O_3

*** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO_2

En los resultados del análisis de efectos principales (Cuadro 8) se muestra que el porcentaje de recuperación por tipo de técnica utilizado en contenido duodenal de ovino, fue superior para VIS *versus* EAA ($P<0.05$) con 105 y 84%.

El análisis de efecto de tipo de marcador indica que la mayor recuperación ($P<0.05$) se obtuvo con $\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$ mientras las obtenidas con TiO_2 y Cr_2O_3 fueron similares ($P>0.05$) lo cual se debió a que TiO_2 dio las recuperaciones menores al ser determinado por VIS; respecto a $\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$ solo fue similar a Cr_2O_3 ($P>0.05$) así mismo no se encontró un efecto lineal ($P>0.05$) en los niveles (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto del tipo de técnica, marcador y nivel sobre la recuperación (%) del marcador en contenido duodenal de ovino (Media \pm Error estándar).

%RECUPERACIÓN					
TÉCNICA	EAA ¹		VIS ²		EEM
	84 \pm 3.2 ^b		105 \pm 6.0 ^a		3.4
MARCADOR	Cr ₂ O ₃	Cr ₂ O ₃ +TiO ₂ [*]	TiO ₂	TiO ₂ +Cr ₂ O ₃ ^{**}	
	76 \pm 2.7 ^{b,c}	73 \pm 1.9 ^c	93 \pm 9.0 ^b	136 \pm 5.6 ^a	3.4
NIVEL %	0.4	0.8	1.2	1.6	
	90 \pm 3.9	91 \pm 6.9	90 \pm 7.3	107 \pm 9.5	

Medias con diferente literal (a, b, c) dentro de las filas son diferentes (P<0.0001)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM Error estándar de la media

* Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr₂O₃

** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO₂

6.1.4. Recuperación de los marcadores en heces de bovino

Se obtuvo una interacción entre el nivel del marcador, técnica y tipo de marcador (P<0.001), con respecto a los porcentajes de recuperación de los marcadores en heces de bovinos. Debe recordarse que las muestras de heces se trabajaron con porcentajes de inclusión del marcador mayor a las muestras anteriores, probablemente por esa razón (como se muestra en el Cuadro 9) la EAA dio resultados cercanos al 100% en Cr₂O₃, ya que a los niveles 0.8, 2.4 y 3.2% las recuperaciones fueron de 90, 111 y 106%, respectivamente; mientras que Cr₂O₃+TiO₂ a los niveles 1.6 y 3.2 % se observaron recuperaciones de 94 y 96% respectivamente; en contraste TiO₂+Cr₂O₃ a los niveles 0.8 y 1.6 % presentaron una recuperación de 116 y 96%, respectivamente. Los valores obtenidos con EAA para Cr₂O₃ fueron superiores en todos los niveles, a la recuperación registrada por medio de VIS, concordando con Carfciofi *et al.* (2007). Lo mismo ocurre con Cr₂O₃+TiO₂ con la única excepción del nivel 0.8%, el cual fue inferior al registrarse por VIS, como lo menciona Kozloski *et al.* (1998).

El TiO₂ y TiO₂+Cr₂O₃ analizados por VIS presentaron valores por mucho superiores al 100% siendo las mayores recuperaciones dentro de la muestra de heces de bovino, en cambio TiO₂ al utilizar EAA presentó las menores recuperaciones dentro del estudio, con

excepción de nivel 0.8% (Cuadro 9), este resultado fue contrario al registrado por Titgmeyer *et al.* (2003) quienes obtuvieron porcentajes de recuperación *in vivo* del 92%. El $TiO_2+Cr_2O_3$ determinado por EAA en el nivel 1.6% presentó la mejor recuperación siendo ésta del 96%.

Cuadro 9. Recuperación (%) de Cr_2O_3 y TiO_2 en heces de bovino con cuatro niveles de marcador analizado por dos técnicas de espectrofotometría.

NIVEL*	Cr_2O_3		$Cr_2O_3 + TiO_2^{**}$		TiO_2		$TiO_2 + Cr_2O_3^{***}$		EEM ³
	VIS ¹	EAA ²	VIS	EAA	VIS	EAA	VIS	EAA	
0.8%	62 ^{klmn}	90 ^{hi}	76 ^{mn}	67 ^{jk}	185 ^a	74 ^j	186 ^a	116 ^{de}	9.06
1.6%	67 ^{jk}	118 ^{de}	63 ⁿ	94 ^{hi}	152 ^c	39 ^o	166 ^b	96 ^{fg}	7.8
2.4%	65 ^{kl}	111 ^{ef}	61 ^{klmn}	85 ⁱ	168 ^b	26 ^p	156 ^c	62 ^{klmn}	8.77
3.2%	65 ^{jklm}	106 ^{fg}	62 ^{klmn}	96 ^{gh}	120 ^d	28 ^p	169 ^b	73 ^j	7.61
EEM ⁴	0.52	2.97	1.76	3.31	6.92	5.56	3.12	6.03	

Interacción técnica x marcador x nivel de marcador $P < 0.001$

Medias con diferente literal ^{a, b, c, (...)} n, o, p son diferentes ($P < 0.001$)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM: error estándar de la media por hileras

⁴ EEM: error estándar de la media por columnas

* Nivel: cantidad en porcentaje del marcador que se agregó a la muestra

** Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr_2O_3

*** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO_2

En los resultados del análisis de efectos principales (Cuadro 10) se muestra que el porcentaje de recuperación por tipo de técnica fue superior para VIS *versus* EAA con 112 y 80% respectivamente ($P < 0.05$).

El análisis de efecto por tipo de marcador, fue similar a la obtenida con contenido duodenal de ovino, donde la mayor recuperación ($P < 0.05$) se observó con $TiO_2 + Cr_2O_3$ mientras las obtenidas con TiO_2 y Cr_2O_3 fueron similares ($P > 0.05$), en cambio con $Cr_2O_3 + TiO_2$ sólo fue similar a Cr_2O_3 ($P > 0.05$)

Cuadro 10. Efecto del tipo de técnica, marcador y nivel sobre la recuperación (%) del marcador en heces de bovino (Media \pm Error estándar).

%RECUPERACIÓN					
TÉCNICA	EAA ¹		VIS ²		EEM
	80 \pm 3.7 ^b		112 \pm 6.6 ^a		4
MARCADOR	Cr ₂ O ₃	Cr ₂ O ₃ +TiO ₂ [*]	TiO ₂	TiO ₂ +Cr ₂ O ₃ ^{**}	EEM
	85 \pm 4.2 ^{bc}	71 \pm 4.2 ^c	99 \pm 11.6 ^b	128 \pm 8.4 ^a	4
NIVEL %	0.8	1.6	2.4	3.2	
	104 \pm 9.1	98 \pm 7.8	91 \pm 8.8	89 \pm 7.6	

Medias con diferente literal (a, b, c) dentro de las filas son diferentes (P<0.0001)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM Error estándar de la media

* Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr₂O₃

** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO₂

6.1.5. Recuperación de los marcadores en heces de ovino

En el análisis de los marcadores en heces de ovino (Cuadro 11) se obtuvo una interacción entre el nivel del marcador, técnica y tipo de marcador (P<0.001). Los porcentajes de recuperación cercanos al 100% en heces de ovino, fueron los determinados por EAA dentro de los niveles 1.6, 2.4 y 3.2% con 107, 109 y 100% para Cr₂O₃, respectivamente; mientras que se obtuvieron 97, 96 y 102% con Cr₂O₃+TiO₂, respectivamente. La recuperación de ambos marcadores obtenida por EAA fue superior a la obtenida por VIS, tal como sucedió con los otros tipos de muestra. Para TiO₂ la mayor recuperación se obtuvo en el nivel 1.6% con 91% y TiO₂+Cr₂O₃ con 104% de recuperación, en el nivel 0.8%, ambos a través del análisis con EAA.

Las recuperaciones de TiO₂ y TiO₂+Cr₂O₃ utilizando VIS fueron superiores al 100% e iguales entre si (P>0.05) y todas fueron superiores a los resultados obtenidos con EAA coincidiendo con Kozloski *et al.* (1998). Sin embargo las recuperaciones con EAA para TiO₂ y TiO₂+Cr₂O₃ disminuyeron (P<0.05) conforme aumentaba el nivel del marcador.

Cuadro 11. Recuperación (%) de Cr₂O₃ y TiO₂ en heces de ovino con cuatro niveles de marcador analizado por dos técnicas de espectrofotometría.

NIVEL*	Cr ₂ O ₃		Cr ₂ O ₃ + TiO ₂ **		TiO ₂		TiO ₂ + Cr ₂ O ₃ ***		EEM ³
	VIS ¹	EAA ²	VIS	EAA	VIS	EAA	VIS	EAA	
0.8%	67 ^{ij}	74 ^{hi}	66 ^{ij}	68 ^{ij}	182 ^b	141 ^c	182 ^b	104 ^{def}	9.02
1.6%	66 ^{ij}	107 ^{de}	58 ^{jk}	97 ^{efg}	188 ^{ab}	91 ^g	193 ^a	79 ^h	9.24
2.4%	65 ^{jk}	109 ^d	60 ^{jk}	96 ^{fg}	187 ^{ab}	73 ^{hi}	189 ^{ab}	64 ^{ij}	9.5
3.2%	66 ^{ij}	100 ^{defg}	59 ^{jk}	102 ^{defg}	187 ^{ab}	52 ^k	192 ^{ab}	61 ^{jk}	10.06
EEM ⁴	0.2	4.03	0.9	3.85	0.68	9.5	1.24	4.91	

Interacción técnica x marcador x nivel de marcador P < 0.001

Medias con diferente literal^{a, b, c, (...)} i, j, k son diferentes (P<0.001)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM: error estándar de la media por hileras

⁴ EEM: error estándar de la media por columnas

* Nivel: cantidad en porcentaje del marcador que se agrego a la muestra

** Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr₂O₃

*** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO₂

Los resultados del análisis de efectos principales (Cuadro 12) indica que el porcentaje de recuperación por tipo de técnica fue superior para VIS *versus* EAA con 125 y 88% respectivamente (P<0.05).

En el efecto por tipo de marcador, la mayor recuperación (P<0.05) se obtuvo con TiO₂+Cr₂O₃. Las recuperaciones con TiO₂ y TiO₂+Cr₂O₃ fueron diferentes (P<0.05) a las obtenidas con Cr₂O₃ y Cr₂O₃+TiO₂. No se observó efecto de nivel (P>0.05)

Cuadro 12. Efecto del tipo de técnica, marcador y nivel sobre la recuperación (%) del marcador en heces de ovino (Media \pm Error estándar).

%RECUPERACIÓN					
TÉCNICA	EAA ¹		VIS ²		EEM
	88 \pm 2.9 ^b		125 \pm 8.0 ^a		4.5
MARCADOR	Cr ₂ O ₃	Cr ₂ O ₃ +TiO ₂ [*]	TiO ₂	TiO ₂ +Cr ₂ O ₃ ^{**}	EEM
	81 \pm 3.5 ^b	76 \pm 3.5 ^b	133 \pm 10.1 ^a	138 \pm 10.8 ^a	4.5
NIVEL %	2.4	3.2	1.6	0.8	
	104 \pm 9.5	102 \pm 10.1	110 \pm 9.2	110 \pm 9.0	

Medias con diferente literal (a, b, c) dentro de las filas son diferentes (P<0.0001)

¹ VIS: Espectrofotometría de luz visible

² EAA: Espectrofotometría de absorción atómica

³ EEM Error estándar de la media

* Combinación de los marcadores analizando únicamente Cr₂O₃

** Combinación de los marcadores analizando únicamente TiO₂

6.2. Experimento 2. Evaluación *in vivo* de los marcadores como marcadores de la digestibilidad aparente en ovinos

Los resultados de la estimación de la digestibilidad aparente comparando la colección total de heces y la recuperación de marcadores Cr_2O_3 , TiO_2 , $\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$, y $\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$, al ser analizados con VIS y EAA, se discuten después de mostrar la composición de las dietas proporcionadas y el consumo de materia seca registrado por parte de los ovinos utilizados en el estudio metabólico.

6.2.1. Composición de las dietas y consumo de materia seca

Las dietas tuvieron una composición química promedio de 919.1 g MS/kg, 870.9 g de MO, 14.9 g de Nitrógeno y 164.7 g de FDN, consistieron de la misma cantidad de ingredientes para cada marcador (Cuadro 13), el consumo del marcador por parte de los ovinos se aseguró proporcionándoles 28% del complemento con una concentración de 1.4% del marcador y todos los demás ingredientes, excepto el grano de Sorgo que se les proporcionó en forma complementaria a las 10:00 y 22:00 horas.

Cuadro 13. Ingredientes y composición química (g/kg MS) de la dieta utilizada en ovinos para la determinación de los marcadores.

Ingredientes (g/kg MS)	Marcador utilizado		
	Cr ₂ O ₃	TiO ₂	Cr ₂ O ₃ + TiO ₂
Sorgo grano	720.0	720.0	720.0
Heno de alfalfa	61.8	61.8	61.8
Heno de avena	123.5	123.5	123.5
Melaza	54.6	54.6	54.6
Urea	10.0	10.0	10.0
Calcio al 38%	11.5	11.5	11.5
Fosfato 18/20	2.0	2.0	2.0
Oxido magnesio	2.1	2.1	2.1
Bicarbonato de Na	5.0	5.0	5.0
Sal	5.0	5.0	5.0
Minerales ganado*	0.5	0.5	0.5
Cr ₂ O ₃	4.0	-	4.0
TiO ₂ ²	-	4.0	4.0

Composición química (g / kg MS)	Cr ₂ O ₃	TiO ₂	Cr ₂ O ₃ + TiO ₂
Materia Seca	917.4	920.6	919.2
Materia Orgánica	871.1	870.2	871.5
Fibra Detergente Neutro	166.3	163.3	164.4
Nitrógeno	15.4	14.9	14.5

*Minerales ganado: Ca 15.0%, P 8.0%, Mg 0.5%, K 0.035%, S 0.2%, Fe 450 mg/kg, Zn 1900 mg/kg, Mn 1800 mg/kg, Se 15 mg/kg, I 30 mg/kg, Co 25 mg/kg.

El consumo fue ajustado al 2.2% del peso vivo de los animales, siendo el consumo general de 909.3 g de MS/d (Cuadro 14), los coeficientes de digestibilidad y la producción de heces por animal en gramos por día, durante los días de muestreo, no fueron afectados por la presencia de marcador ($P>0.05$) (Cuadro 15), siendo similar a los resultados de Titgmeyer *et al.* (2001), Kavanagh *et al.* (2000) y Jagger *et al.* (1991).

Cuadro 14. Consumo (g MS/ d) en ovinos alimentados al 2.2 % PV con la adición de Cr₂O₃, TiO₂ y Cr₂O₃+TiO₂. (Media ± Error estándar)

Ingestión	Cr ₂ O ₃ ¹	TiO ₂ ²	Cr ₂ O ₃ + TiO ₂ ³
Materia seca	909.3 ± 52	909.3 ± 52	909.3 ± 52
Materia orgánica	863.4 ± 49	859.6 ± 49	862.1 ± 49
FDN ⁴	179.0 ± 10	175.5 ± 10	177.0 ± 10

⁴ FDN: fibra detergente neutro

Los resultados de digestibilidad aparente *in vivo* para MS, MO y FDN por medio de la colección total de heces se muestran en el Cuadro 15. No hubo diferencia (P>0.05) en la digestibilidad de los principios químicos.

Cuadro 15. Digestibilidad aparente (g/kg MS) obtenida por CTH (g/d) y producción de heces en ovinos en los grupos adicionados con Cr₂O₃, TiO₂ y Cr₂O₃+TiO₂.

	Cr ₂ O ₃ ¹	TiO ₂ ²	Cr ₂ O ₃ + TiO ₂ ³	EEM ⁴	P value ⁵
Producción de heces en (g MS/d)					
	166.6	168.3	164.2	12.2	0.31
Digestibilidad aparente del tracto digestivo total					
Materia seca	820.7	817.4	821.1	9.4	0.14
Materia orgánica	841.9	837.6	842.8	8.7	0.12
FDN ⁶	502.3	483.7	498.0	11.8	0.45
Nitrógeno	653.5	632.8	642.1	4.0	0.41

Marcadores

¹ 0.4% de Cr₂O₃

² 0.4% TiO₂

³ 0.4% Cr₂O₃ + 0.4% TiO₂

⁴ EEM: error estándar de la media

⁵ P value: valor de significancia

⁶ FDN: fibra detergente neutro

6.2.2. Recuperación de los marcadores *in vivo*

El porcentaje de recuperación de Cr_2O_3 y $\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$ fue similar ($p > 0.05$) siendo de 83.5 y 94.2 % analizados por VIS. Mientras la determinación por EAA arrojó valores de 76.6 y 73.3%, respectivamente, sin presentar diferencia ($P > 0.05$) (Cuadro 16), los valores obtenidos difieren con Titgmeyer *et al.* (2001) que recuperó el 112% de $\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$ analizado por EAA con la técnica de Williams *et al.* (1962). En otro estudio Kavanagh *et al.* (2001) indicaron recuperaciones del 96% en dietas de cerdos adicionando el Cr_2O_3 a 1g/kgkg, analizado por la misma técnica, sin embargo Jagger *et al.* (1992) obtuvieron recuperaciones del 74.6 y 79.7% para dietas adicionadas con 1 y 5 g/KgKg, sin la combinación con TiO_2 al utilizar la técnica colorimétrica de Fenton y Fenton (1979). Utilizando esa misma técnica Carciofi *et al.* (2007) recuperaron 106 ± 0.044 y 101 ± 0.045 % de Cr_2O_3 con EEF y VIS, respectivamente en un estudio hecho con perros.

La recuperación de TiO_2 (43.7 %) y $\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$ (59.1 %), analizados por VIS (Cuadro 16) no fueron diferentes entre sí ($P > 0.05$). Los porcentajes de recuperación difieren con Jagger *et al.* (1992) quienes señalaron recuperaciones de TiO_2 sin combinar con Cr_2O_3 del 98.3 y 96.9% cuando adicionaron 1 y 5 g/kg del marcador en el alimento en cerdos, por otra parte Kavanagh *et al.* (2001) quienes encontraron recuperaciones de 92.3% con 1g/kgkg también en dietas de cerdos al ser combinado con Cr_2O_3 , mientras Titgmeyer *et al.* (2001) registraron recuperaciones del 95% al ser adicionado con 5g /kg en dietas de novillos, Hafez *et al.* (1988) obtuvieron 99% de recuperación en dietas basadas en concentrado, ensilado de maíz y forraje. Al respecto, Jagger *et al.* (1992) mencionan que las recuperaciones menores del marcador pueden atribuirse al tamaño de partícula en el que es proporcionado el marcador, debido a que este puede llegar a ser retenido en el tracto gastrointestinal. Por otra parte Kavanagh *et al.* (2001) hacen mención en la variabilidad de recuperación del marcador debido a una mala mezcla de este con el alimento.

Las diferentes metodologías en el análisis de TiO_2 varía desde el uso de sustancias para la suspensión húmeda así como en la longitud de onda utilizada, en el presente estudio se utilizó una longitud de onda de 410 nm, mientras que en la mayoría de las recuperaciones mencionadas los investigadores utilizaron en VIS: 408 nm por Jagger *et al.* (1992); 400 nm Kavanagh *et al.* (2001) y 410 nm por Titgmeyer *et al.* (2001), por lo

que la longitud de onda utilizada en cada técnica puede afectar la sensibilidad obtenida para TiO_2 , como lo menciona Myers *et al.* (2004) quienes reportaron mejores recuperaciones al utilizar 409 *versus* 410 nm.

El análisis por medio de EAA dio recuperaciones mayores 172.2 y 171.4 %, para TiO_2 y $\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$, respectivamente, sin diferencias entre marcadores ($P > 0.05$) (Cuadro 16). La sobre estimación obtenida puede deberse al efecto realizado por diversos minerales como Fe, Ni, Cu, Co y Cr, que en la mezcla con Ti pueden incrementar la lectura como lo menciona Leone (1973),

Cuadro 16. Porcentaje de recuperación de los marcadores.

MARCADORES ¹	CrVIS ²	CrEAA ³	TiVIS ⁴	TiEAA ⁵
Cr_2O_3	83.5 ^{ab}	76.6 ^{ab}	-	-
TiO_2	-	-	43.7 ^a	172.2 ^c
$\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$	94.2 ^b	73.3 ^b	59.1 ^{ab}	171.4 ^c
EEM ⁶	4.5	5.4	11.0	3.9

^{abc} Literales distintas son diferentes $P < 0.05$

¹ Marcadores

1: 0.4% de Cr_2O_3

2: 0.4% TiO_2

3: 0.4% $\text{Cr}_2\text{O}_3 + 0.4\%$ TiO_2

² CrVIS: Cr_2O_3 determinado por luz visible

³ CrEAA: Cr_2O_3 determinado por espectrofotometría de absorción atómica

⁴ TiVIS: TiO_2 determinado por luz visible

⁵ TiEAA: TiO_2 determinado por espectrofotometría de absorción atómica

⁶ EEM error estándar de la media

6.2.3. Consumo de Nitrógeno y recuperación en heces

El consumo de nitrógeno y su recuperación en heces se muestra en el Cuadro 17, donde se encontró diferencia ($P < 0.05$) con respecto a la excreción de nitrógeno calculado con CTH y TiO_2 determinado por VIS, en la heces correspondientes a la dieta 2 (0.4% TiO_2), sobreestimando la excreción de N, siendo resultados diferentes a los reportados por Titgmeyer *et al.* (2001) quienes obtuvieron una subestimación de los valores calculados con TiO_2 . Los demás marcadores con respecto a la excreción de nitrógeno registraron cantidades similares a CTH de su respectiva dieta.

Cuadro 17. Nitrógeno consumido (g/d), nitrógeno excretado (g/d) y balance, obtenido a partir de colección total de heces, Cr_2O_3 , TiO_2 y $Cr_2O_3+TiO_2$.

MARCADORES ¹	N CONSUMIDO		N EXCRETADO				EEM2
	CTH ²	CrVIS ³	CrEAA ⁴	TiVIS ⁵	TiEAA ⁶		
1	15.3	5.2 ^{ab}	5.7 ^b	5.5 ^b	-	-	
2	14.7	3.0 ^a	-	-	5.6 ^b	4.7 ^{ab}	
3	14.3	4.2 ^{ab}	6.1 ^b	6.5 ^b	5.9 ^b	5.2 ^{ab}	
EEM1	0.5	0.2	0.5	0.3	0.3	0.4	0.2

^{ab} Literales distintas son diferentes $P < 0.05$

¹ Marcadores

1: 0.4% de Cr_2O_3

2: 0.4% TiO_2

3: 0.4% Cr_2O_3 + 0.4% TiO_2

² CTH: colección total de heces

³ CrVIS: Cr_2O_3 determinado por luz visible

⁴ CrEAA: Cr_2O_3 determinado por espectrofotometría de absorción atómica

⁵ TiVIS: TiO_2 determinado por luz visible

⁶ TiEAA: TiO_2 determinado por espectrofotometría de absorción atómica

EEM1: Error estándar de la media por columnas

EEM2: Error estándar de la media general

6.2.4. Comparación de la estimación del coeficiente de digestibilidad aparente del tracto digestivo total obtenida a partir de CTH, Cr₂O₃ y TiO₂ determinados con diferentes técnicas de espectrofotometría

La producción de heces (g/d), no difieren entre la calculada por CTH y los marcadores (P=0.121) (Cuadro 18). Solamente la digestibilidad de MS, MO, FDN y N obtenida por CTH3 difiere de Cr₂O₃ + TiO₂ determinado por VIS y EAA (P<0.05) (Cuadro 18). Este resultado es diferente al encontrado por Carciofi *et al.* (2007) quienes no obtuvieron diferencias en la digestibilidad utilizando CTH y determinación de Cr₂O₃, por VIS o EEF; mientras que Titgmeyer *et al.* (2001) obtuvieron diferencias al comparar la CTH con Cr₂O₃ y TiO₂ con el primer marcador se sobrestimó la digestibilidad y al contrario con TiO₂ se subestimo la digestibilidad. En otro estudio, Kavangh *et al.* (2001) obtuvieron valores iguales entre CTH y Cr₂O₃, mientras los valores obtenidos con TiO₂ fueron menores. Las diferencias obtenidos entre técnicas y marcadores para los coeficientes de digestibilidad de materia seca, materia orgánica fibra detergente neutro y nitrógeno fueron menores al utilizar Cr₂O₃ + TiO₂ analizados por VIS y EAA (P<0.05).

Cuadro 18. Producción de heces y digestibilidad aparente (%) del tracto digestivo total obtenido por medio de la colección total de heces, Cr₂O₃ y TiO₂ determinados por dos técnicas de espectrofotometría.

	MARCADORES ¹	CTH ²	CrVIS ³	CrEAA ⁴	TiVIS ⁵	TiEAA ⁶	EEM ⁷
Producción, g/heces	1	166.6	226.3	218.3	-	-	
	2	168.3	-	-	227.4	188.8	
	3	164.2	243.5	262.5	234.1	209.5	
	EEM ⁸	10.6	19.8	15.6	13.3	15.8	7.6
Digestibilidad de la Materia Seca	1	82.1 ^b	75.5 ^{ab}	76.1 ^{ab}	-	-	
	2	81.7 ^b	-	-	74.9 ^{ab}	79.1 ^{ab}	
	3	82.1 ^b	73.6 ^a	71.8 ^a	74.5 ^{ab}	77.4 ^{ab}	
	EEM	8.2	1.4	1	1.1	1.1	0.6
Digestibilidad de la Materia Orgánica	1	84.2 ^c	78.4 ^{abc}	78.9 ^{abc}	-	-	
	2	83.8 ^{b, c}	-	-	77.7 ^{abc}	81.4 ^{abc}	
	3	84.3 ^c	76.8 ^{ab}	75.0 ^a	77.6 ^{abc}	80.1 ^{abc}	
	EEM	7.5	1.3	0.9	1	1.1	0.6
Digestibilidad de la Fibra Detergente Neutro	1	50.2 ^c	30.1 ^{abc}	31.4 ^{abc}	-	-	
	2	48.4 ^{b, c}	-	-	25.8 ^{ab}	39.2 ^{abc}	
	3	49.8 ^c	25.7 ^{ab}	18.6 ^a	28.0 ^{abc}	35.3 ^{abc}	
	EEM	6.4	3.2	3.7	4.4	3.9	1.8
Digestibilidad Nitrógeno	1	65.3 ^{abc}	63.1 ^{abc}	64.2 ^{abc}	-	-	
	2	79.3 ^c	-	-	60.9 ^{abc}	67.8 ^{abc}	
	3	70.9 ^{bc}	56.6 ^a	53.6 ^a	57.8 ^{cb}	62.2 ^{abc}	
	EEM	2.0	3.3	2.7	3.5	3.5	1.4

Producción, g/heces P>0.05

^{abc} Literales distintas son diferentes P<0.05

¹ Marcadores

1: 0.4% de Cr₂O₃

2: 0.4% TiO₂

3: 0.4% Cr₂O₃ + 0.4% TiO₂

² CTH: colección total de heces

³ CrVIS: Cr₂O₃ determinado por luz visible

⁴ CrEAA: Cr₂O₃ determinado por espectrofotometría de absorción atómica

⁵ TiVIS: TiO₂ determinado por luz visible

⁶ TiEAA: TiO₂ determinado por espectrofotometría de absorción atómica

⁷ EEM: error estándar de la media general

⁸ EEM: error estándar de la media por columnas

Las diferencias encontradas entre la CTH3 y la digestibilidad obtenida con Cr₂O₃+TiO₂ analizado por VIS y EAA, puede deberse a las variaciones en precisión del análisis del marcador al utilizar la suspensión húmeda propuesta por Hill y Anderson (1958) ya que Kavanagh *et al.* (2001) y Titgmeyer *et al.* (2001) reportaron en estudios *in vivo* valores

similares a CTH al utilizar Cr_2O_3 mezclado con TiO_2 determinado por la técnica de EAA de Williams *et al.* (1962), ya que dentro de esta técnica excluyen el uso de HClO_4 debido a que puede saturar las soluciones con perclorato de potasio y ocasionar errores en la lectura.

7. Conclusiones

Experimento 1. Recuperación de marcador en distintas muestras utilizando distinto nivel de marcador y dos técnicas de espectrofotometría.

Las diferencias en los porcentajes de recuperación *in vitro* de los marcadores utilizados (Cr_2O_3 , TiO_2) y su mezcla ($\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$, $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$) fueron diferentes para cada nivel y técnica utilizada para su determinación (EAA y VIS), por lo que las técnicas no siempre darán el 100% de recuperación de los marcadores, independientemente de la muestra a analizar.

La EAA registró recuperaciones cercanas al 100% y superiores a VIS en los niveles 1.6% al 3.2% por lo que se aconseja utilizar estos niveles en próximos estudios de digestibilidad al utilizar Cr_2O_3 y $\text{Cr}_2\text{O}_3+\text{TiO}_2$ como marcadores.

La recuperación de los marcadores TiO_2 y $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$ fueron distintas según la técnica de análisis utilizada en diferentes tipos de muestra y nivel, ya que dicha variación puede deberse a que las muestras contienen minerales (Fe, Ni, Cu, Co y Cr) y burbujas en la solución que afecten el estudio de TiO_2 en EAA y VIS respectivamente, por lo que se aconseja mayor investigación para reducir estos efectos.

Experimento 2. Estimación de la digestibilidad aparente utilizando colección total de heces o recuperación de marcadores Cr_2O_3 , TiO_2 , $\text{Cr}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$, y $\text{TiO}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$, en heces de ovinos analizadas por VIS o EAA.

La variación en recuperación encontrada en el experimento 1 no afectó al predicción de los coeficientes de digestibilidad aparente obtenidos por medio del TiO_2 y $\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$ a los obtenidos por CTH o utilización de Cr_2O_3 por medio de su recuperación en heces, determinados tanto por EAA como por VIS, por lo que la utilización de TiO_2 solo o mezclado con cromo ($\text{TiO}_2+\text{Cr}_2\text{O}_3$) puede ser una alternativa a CTH y Cr_2O_3 , para la estimación de la digestibilidad aparente del tracto digestivo total en ovinos

8. Bibliografía

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Method of Analysis of AOAC International* 15th edn. AOAC International, Arlington, VA, 1991.

Austreng E, Storebakken T, Thomassen MS, Refstie S, Thomassen Y. Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers used to estimate apparent digestibility in salmonids. *Aquaculture* 2000; 188(1/2): 65-78.

Ayala MM. Comparación de las técnicas de n-alcanos y óxido de cromo para estimar consumo y digestibilidad en ovinos (tesis de Maestría en Ciencias). Distrito Federal México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.

Barriol MF, Arribas JS, Lucen CF, Hernandez MJ. *Química analítica cualitativa*. España. Paraninfo, 1999.

Carciofi CA. Souza VR. Domingues OL. Antonio BM. Valerio AG. Sousa BR. Martins CE. Prada F. Chromic oxide as a digestibility marker for dogs A comparison of methods of analysis. *Animal Feed Science and Technology*. 134 (2007) 273–282.

Czarnocki J, Sibbald IR, Evans EV. The determination of the chromic oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry. *Canadian Journal of Animal Science* 1961; 41: 167-179

Chandler PT, Kesler EM y McCarthy RD. Polyethylene as a reference substance for digestion studies with young ruminants. *J. Dairy Sci.* 1964; 47: 1426.

Christian KR, Coup MR. Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. VI. The determination of chromic oxide in faeces. *N.Z. J. Sci. Technol.* 1954; A36, 328–330.

Church DC, Pond WG, Pond KR. *Nutrición y alimentación de animales*. 2ed. México Limusa, 2003.

Cooke BC. Evaluation of feeds for ration formulation. Proceedings of the Nutrition Society (UK). 1988; 47(2): 135-141.

Cochran GW and Cox MG. Experimental Designs. 2nd Edition. USA. Wiley Publications in statistics. 1957

Dove H, Mayes RW. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores. A review, Australian Journal. *Agriculture. Research*. 1991; 42:913-952

Fadel, JG, Uden P, y Robinson PH. Effect of nitrogen and energy supplements on intake and digestion of oat straw by non-lactating dairy cows. *Journal Agriculture Science, Cambridge*. 1987; 109:503.

Fahey GC y Jung HG. Lignin as marker in digestion studies: A review. *Journal of Animal Science*. 1983; 57:220 - 225.

Farrell DJ, Chan C y McCrae F. A nutritional evaluation of triticale with pigs. *Animal Feed Science and Technology* 1983: 9; 49-62.

Fenton TW, Fenton M. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Canadian Journal Animal Science*. 1979: 59; 631–634.

Fritz JS, Schenk GH. Quantitative analytical chemistry. 4th edition. USA. Boston: Allyn and Bacon, 1979.

Gidenne T, Lapanouse A. Rate of passage in the rabbit digestive tract: influence of marker dosing time, ileal cannulation and marker type. *World-Rabbit-Science*. 1997; 5(1): 27-32.

Harris DC. *Análisis químico cuantitativo*. 3ra Ed. México. Iberoamericana, 1991.

Haswell SJ. Atomic Absorbstion spectrometry. *Theory, design and applications*. United States. Elsevier Science Publisher, 1991

Hafez S, Junge W, and Kalm E. Estimation of digestibility with an indicator method in comparison to the "Hohenheimerfutterwert- test". *Archives of Tierernaehr.* 1998: 38;929–945.

Hildon MA. Use of an Atomic Absorption spectrophotometer for colorimetric analysis. *Analytical chemistry.* 1971: 43, 7; 973-974.

Hill FW, Anderson DL. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *Journal of Nutrition.* 1958; 64, 4; 587-603.

Imbeah M. Sauer WC. Caine WR. Comparison of the single dose and withdrawal method for measuring the rate of passage of two digestibility markers in digesta collected from the distal ileum and feces in growing pigs. *Animal Feed Science and Technology.* 1995; 52(1/2): 41-50.

Kane EA, Jacobson WC, y Moore LA. A Comparison of techniques used in digestibility studies with dairy cattle. *Journal of Nutrition.* 1950: 41; 583 - 596.

Knapka JJ, Earth KM, Brown DG & Cragle RG. Evaluation of polyethylene, chromic oxide, and cerium-144 as digestibility indicators in donkeys. *Journal of Nutrition.* 1992: 67; 79-85.

Kavanagh S, Lynch PB, Mara FO, Caffrey PJ. A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 2001; 49-58

Kotb, AR. y Luckey TD. Markers in nutrition. *Nutrition Abstracts and Reviews* 1972, 42: 813 - 845.

Kozloski, GV. Flores EMM. Martins AF. Use of chromium oxide in digestibility studies: variations of the results as a function of the measurement method. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1998: 76; 373–376.

Krawielitzki, K., R. Schadereit, E. Borgmann, y B. Evers. Cr₂O₃ and TiO₂ as markers for estimating passage rate and protein digestibility in rats. *Archives of Animal Nutrition*. 1987; 37;1085–1099.

Kuehl OR. *Diseño de experimentos*. 2a ed. México. Thompson editores. 2001

Lachmann M, Araujo FO. La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes. departamento de producción e industria animal. Universidad de Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias [On line] Marzo 2005 (Consultado 27 Abril 2008): [6 páginas] disponible en: www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/Digestibilidadderumiantes.pdf

Leone JL. Collaborative study of the quantitative determination of titanium dioxide in cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1973; 56(3); 535-537.

Mir PS, Kalnin CM, Garvey SA. Recovery of fecal chromium used as a digestibility marker in cattle. *J. Dairy Sci*. 1989; 72; 2549–2553.

Myers WD, Ludden PA, Nayigihugu V, HessBW. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science*. 2004; 82; 179–183

Ørskov ER. Starch digestion and utilization in ruminants. *Journal of Animal Science* 1986; 63;1634-1648.

Owens FN, Handson CF. Symposium external an internal markers. External and internal markers for appraising site extent of digestion in ruminants. *Journal of Dairy Science*. 1992; 75:2605-2617

Peddie J, Dewar WA, Gilbert AB, and Waddington D. The use of titanium dioxide for determining apparent digestibility in mature domestic fowls (*Gallus domesticus*). *Journal of Agriculture Science*. 1982; 99:233–236.

Perez JF, Gassa J, Castrillo C, Guada JA. Validación de marcadores para estimar la digestibilidad y la ingestión de paja tratada con amoniaco en ovejas. *Archivos de Zootecnia* 1994;43:71-80.

Piasentier E, Bovolenta S, Malassoni F, Susmel P. Comparision of *n*-alcanes or chromium oxide methods for estimation of herbage intake by sheep. *Small Rumiants Research* 18 (1995) 27-32

Pina DS. Valadares-Filho SC. Detmann E. Valadares RFD. Campos MS. Moraes KA. Oliveira AS. Paixao ML. Comparison of internal markers and extent of total fecal collection to estimate nutrient digestibility and energy value of feeds on dairy cows fed different protein sources. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2006; 35(6): 2461-2468.

Richter H, Lückstädt C, Focken U y Becker K. Evacuation of pelleted feed and the suitability of titanium (IV) oxide as feed marker for gut kinetics in Nile tilapia. *Journal of Fisheries Biology*. 2003;63; 1080-1099.

Robertson JB and Van Soest PJ. *The detergent system of analysis and its application to human foods. The analysis of dietary fiber*. 1981 Marcell Dekker New York.

Robinson PH, Taminga S, and Van Vuuren AM. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on milk production and whole tract digestibility in dairy cows. *Livest. Prod. Sci*. 1987: 17:19.

Russell RW, Mc Guillard AD, Berger PJ, Young JW. Evaluation of turbidimetric determination of polyethylene glycol. *Journal Dairy Science*, 1982: 65; 1798- 1803.

Saha DC, Gilbreath RL. Analytical recovery of chromium from diet and faeces determined by colorimetry and atomic absorption spectrophotometry. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 1991; 55:433-446.

Sales J, Janssens G. Acid-insoluble ash as a marker in digestibility studies: a review. Ghent University, Merelbeke (Belgium). Dept. of animal nutrition, genetics, breeding and ethology, Laboratory of aAnimal nutrition. *Journal of Animal and Feed Sciences* (Poland). 2003; 12(3): 383-401.

Sales J, Janssens GP. The use of markers to determine energy metabolizability and nutrient digestibility in avian species. *World's Poultry Science Journal*. 2003; 59(3): 314-327

Sandoval CC, Quijano CR, Ramírez AL y Cetina GR. Determinación de cromo en heces bovinas: variaciones en los resultados en función de la fuente de heces para la preparación de la curva de calibración. *Revista Biomédica* 2001; 12:180-184.

SAS. *Statistical Analysis System Insitute*. Cary, NC, USA. SAS users guide: Statistics, version 8. SAS Institute, 1999.

Short FJ, Gorton P, Wiseman J, y Boorman KN. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal Feed Science Technology*. 1996: 59:215–221.

Shimada MA. *Nutrición animal*. México. Ed. Trillas, 2007.

Steven DM, Van-Ryssen JB y Marais JP. Use of n-alkane markers to estimate the intake and apparent digestibility of ryegrass and Kikuyu by horses. *South African Journal of Animal Science*. 2002; 32(1): 50-56

Softley TP. Atomic spectra. Physical chemistry laboratory. United States. Oxford university, 1994

SPSS, Statical Package for the Social Sciences, Chicago IL, USA. Guía breve de SPSS 15.0. SPSS, 2006.

Titgemeyer EC, Armendariz CK, Bindel DJ, Greenwood RH, y Loest CA. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker in cattle. *Journal of Animal Science*. 2001; 79:1059–1063.

Tukey JW. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*. 1949; 5: 99-114.

Van Soest, PJ. *Nutritional Ecology of the ruminant*. Cornell University Press. 2a ed. 1994.

Van Soest PJ, Robertson JB y Leuvia BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*. 1991; 74:3583-3597.

Williams CH, David DJ, Lismaa O. The determination of chromic oxide in feces samples by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Agriculture Science*. 1962; 59:381–385.

Yiakoulaki MD, Papadoyannis IN y Nastis AS. Determination of marker chromic oxide in feces of grazing goats on Mediterranean shrublands by ASS. *Animal feed science and technology*. 1997; 67:163-168.

Zinn RA, Plascencia A. Interaction of whole cottonseed and supplemental fat on digestive function in cattle. *Journal of Animal Science*. 1993; 71:11-17.