

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**" ESTIMACIÓN DE EXCRECIÓN FECAL TOTAL EN ALPACAS
(*Vicugna pacos*) BAJO CONDICIONES ESTABULADAS USANDO
DIOXIDO DE TITANIO COMO MARCADOR EXTERNO"**

Presentada por:

ROSINA JULIETA CAMARGO HURTADO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
NUTRICIÓN**

LIMA-PERÚ

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**" ESTIMACIÓN DE EXCRECIÓN FECAL TOTAL EN ALPACAS
(*Vicugna pacos*) BAJO CONDICIONES ESTABULADAS USANDO
DIOXIDO DE TITANIO COMO MARCADOR EXTERNO"**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE

Presentada por:

ROSINA JULIETA CAMARGO HURTADO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Carlos Gómez Bravo

PRESIDENTE

Ph.D. Carlos Vílchez Perales

ASESOR

Mg.Sc. Víctor Hidalgo Lozano

MIEMBRO

Mg. Sc. Gloria Palacios Pinto

MIEMBRO

AGRADECIMIENTO

Me gustaría agradecer en estas líneas la ayuda que muchas personas y colegas que me han ayudado durante el proceso de investigación y redacción de este trabajo. En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres, mi hermana y mi familia en general que me han apoyado en todo este proceso; así como también a mi asesor el Doctor Carlos Vílchez por la guía y paciencia en todo mi producto.

A todos mis amigos y colegas que me ayudaron de una manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina por ser la sede de todo el conocimiento adquirido en estos años.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
	2.1. CONSUMO DE ALIMENTO EN ALPACAS.....	3
	2.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE ALIMENTO	6
	2.3. MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE EXCRECIÓN FECAL TOTAL.....	8
	2.3.1. MÉTODOS DIRECTOS DE ESTIMACIÓN DE EXCRECIÓN FECAL TOTAL.....	8
	2.3.2. MÉTODOS INDIRECTOS DE ESTIMACIÓN DE EXCRECIÓN FECAL TOTAL	10
	2.4. MARCADORES INTERNOS.....	11
	2.5. MARCADORES EXTERNOS.....	11
	2.6. USO DE DIÓXIDO DE TITANIO COMO MARCADOR EXTERNO.....	14
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
V.	CONCLUSIONES	32
VI.	RECOMENDACIONES	33
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
VIII.	ANEXOS	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies, cantidades, frecuencia y vía de administración de TiO ₂ usado como marcador externo para estudios de nutrición.....	15
Cuadro 2. Distribución de las alpacas en los diferentes tratamientos y en cada periodo experimental.....	19
Cuadro 3. Promedio de excreción fecal total estimada con dióxido de titanio y observada en alpacas en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 (n=7).....	24
Cuadro 4. Porcentaje de recuperación de dióxido de titanio en heces de alpacas.....	26
Cuadro 5. Parámetros (promedio ± DE) del patrón de excreción de dióxido de titanio en heces de alpaca.....	29

ÍNDICE DE LOS ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de dióxido de titanio.....	40
Anexo 2. Parámetros de excreción de TiO ₂ del promedio del tratamiento 1.....	41
Anexo 3. Peso de heces estimado con el dióxido de titanio y peso de heces observado con las bolsas colectoras.....	42
Anexo 4. Porcentajes de recuperación del dióxido de titanio.....	43
Anexo 5. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 1, tratamiento 1 y periodo 1.....	44
Anexo 6. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 2, tratamiento 1 y periodo 2.....	45
Anexo 7. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 2, tratamiento 1 y periodo 2.....	46
Anexo 8. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 4, tratamiento 1 y periodo 4.....	47
Anexo 9. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 1, tratamiento 2 y periodo 2.....	48
Anexo 10. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 2, tratamiento 2 y periodo 3.....	49
Anexo 11. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 3, tratamiento 2 y periodo 4.....	50
Anexo 12. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 4, tratamiento 2 y periodo 1.....	51
Anexo 13. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 1, tratamiento 3 y periodo 3.....	52
Anexo 14. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 2, tratamiento 3 y periodo 4.....	53
Anexo 15. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 3, tratamiento 3 y periodo 1.....	54
Anexo 16. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 4, tratamiento 3 y periodo 2.....	55
Anexo 17. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 1, tratamiento 4 y periodo 4.....	56
Anexo 18. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 2, tratamiento 4 y periodo 1.....	57
Anexo 19. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 3, tratamiento 4 y periodo 2.....	58
Anexo 20. Parámetros de excreción de TiO ₂ del animal 2, tratamiento 1 y periodo 2.....	59
Anexo 21. Valores de los parámetros del patrón de excreción de dióxido de titanio.....	60

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo el uso del dióxido de titanio (TiO_2) como marcador externo para la estimación de excreción total de heces en alpacas. Para lo cual se llevó a cabo un diseño cuadrado latino 4 x 4, con cuatro animales, cuatro tratamientos y cuatro periodos, cada periodo tuvo una duración de 21 d. Se usaron cuatro tratamientos: tratamiento A (TA) recibió 2.5 g de TiO_2 /animal una vez al día (7:00 am), tratamiento B (TB) 1.25 g de TiO_2 /animal dos veces al día (7:00 am y 4:00 pm), tratamiento C (TC) 5 g de TiO_2 /animal una vez al día (7:00 am) y tratamiento D (TD) 2.5 g de TiO_2 /animal dos veces al día (7:00 am y 4:00 pm). El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SAS 9.4 (2016) mediante el análisis de varianza (ANDEVA) con la prueba de Duncan, mediante el T de STUDENT el cual se le aplicó un nivel de significancia de 5%. Los promedios de producción de heces estimada con TiO_2 versus producción de heces observada directamente entre los TB, TC y TD tuvo diferencias. Sin embargo, en el TA no se encontró diferencias. El porcentaje de la recuperación de TiO_2 fueron de 90, 82, 78% 52%, respectivamente, en los cuatro tratamientos. Siendo el TD diferente a los otros tratamientos. Los parámetros del patrón de excreción de TiO_2 fueron el tiempo cero (a), la máxima excreción de TiO_2 (b), la tasa constante de excreción de b (c), el tiempo necesario de excreción de TiO_2 para que haya excretado la mitad de la concentración inicial (T medio) y el tiempo en el que se alcanza el equilibrio de excreción (T_{a+b}); de los cuales los valores de a, c, T medio y T_{a+b} no encontró diferencia entre los tratamientos, pero si hubo diferencia estadística significativa del valor de b entre las cantidades de administración del marcador de 2.5 g vs 5 g. En conclusión, el uso de TiO_2 como marcador para la estimación de excreción fecal total en alpacas es posible con 2.5 g de TiO_2 /animal, una vez al día, además en alpacas el equilibrio de excreción de TiO_2 se alcanza aproximadamente a los ocho días de administración del marcador y es el tiempo óptimo para estimar excreción fecal total.

Palabras claves: Dióxido de titanio, alpacas, excreción fecal total y marcador externo.

ABSTRACT

The study was aimed at the use of titanium dioxide (TiO_2) as external marker for estimation total fecal excretion in alpacas. For which a 4 x 4 Latin square design was carried out, with four animals, four treatments and four periods, each period lasting 21 d. Four treatments were used: treatment A (TA) received 2.5 g of TiO_2 / animal once daily (7:00 am), treatment B (TB) 1.25 g of TiO_2 / animal twice daily (7:00 am and 4 : 00 pm), treatment C (TC) 5 g TiO_2 / animal once daily (7:00 am) and treatment D (TD) 2.5 g TiO_2 / animal twice daily (7:00 am and 4: 00 pm). Statistical analysis was performed using the statistical analysis program SAS 9.4 (2016) through the analysis of variance (ANDEVA) with the Duncan test, using the STUDENT T test, which was applied a significance level of 5%. The averages of stool production estimated with TiO_2 versus stool production observed directly between TB, TC and TD had differences. However, in the TA, no differences were found. The percentage of TiO_2 recovery was 90, 82, 78%, 52%, respectively, in all four treatments. The TD being different from the other treatments. The parameters of the TiO_2 excretion pattern were time zero (a), maximal excretion of TiO_2 (b), constant rate of excretion of b (c), time required for excretion of TiO_2 , to have excreted half of the initial concentration (half T) and the time at which the excretion balance ($T_a + b$) is reached; of which the values of a, c, T mean and $T_a + b$ found no difference between treatments, but if there was a statistically significant difference of the value of b between the amounts of administration of the marker of 2.5 g vs 5 g. In conclusion, the use of TiO_2 as a marker for the estimation total fecal excretion in alpacas is possible with 2.5 g of TiO_2 / animal, once a day, in addition in alpacas the balance of excretion of TiO_2 is reached approximately eight days after the administration of the marker and is the optimal time to estimate total fecal excretion.

Keywords: Titanium dioxide, alpacas, total fecal excretion and external marker.

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimento es un parámetro de suma importancia para el manejo de la alimentación en producción animal; medir este parámetro es aún más necesario en animales al pastoreo ya que con esta información se podría estimar la soportabilidad de la pradera y el estatus nutricional de los animales. A pesar de la importancia de la valoración del consumo, la información de este parámetro en praderas alto-andinas es escasa, más aún en alpacas, que para su alimentación dependen de estas praderas (San Martín, 1987).

En la actualidad, se han desarrollado numerosos métodos para determinar el consumo en animales al pastoreo; sin embargo, la medición directa y el método estándar de oro para estimar este parámetro, no es aún posible. Por lo que se han propuesto numerosos métodos indirectos para su estimación; entre ellos uno de los métodos con mejor confiabilidad de estimación de consumo es la relación excreción fecal total sobre la indigestibilidad del alimento (Haro, 2002). La estimación de la excreción fecal total; puede ser por medición directa o indirecta. La directa se realiza mediante la colocación de bolsas colectoras al cuerpo de los animales y la medición indirecta mediante el uso de materiales indigestibles del alimento como marcadores, ya sean materiales orgánicos, propios del alimento; o inorgánico, añadidos al alimento (Titgemeyer, 1997).

El marcador inorgánico más usado para estimar excreción fecal total en rumiantes al pastoreo fue el óxido crómico (Cr_2O_3). Sin embargo, la recuperación de Cr_2O_3 varía grandemente entre animales y además posee propiedades negativas cuando es inhalado por los que manipulan el material. En los últimos años muchos investigadores proponen una alternativa al uso Cr_2O_3 ; este es el dióxido de titanio (TiO_2) ya que presenta menor variabilidad entre animales en la estimación de la excreción fecal total, se excreta el 100% en las heces, es compatible con las mucosas y la piel y además no es negativa para la salud ni el medio ambiente (Mayes *et al.*, 1995; Dove y Mayes, 2006). El TiO_2 se viene usado en múltiples estudios en bovinos y ovinos al pastoreo (Titgemeyer *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2006; Glindemann *et al.*, 2009), pero no se reportan estudios previos con el uso de algún marcador para

estimar excreción fecal total en alpacas, así como lo referente a sus similitudes o diferencias con esta especie; de tal forma que, este podría ser uno de los primeros ensayos utilizando el TiO_2 como marcador.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de TiO_2 en alpacas estabuladas para la estimación de excreción fecal total en un día.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Consumo de alimento en alpacas

En producción de alpacas como en cualquier otra actividad de producción el objetivo es transformar los alimentos con la mayor eficiencia posible y para lograr esta transformación es necesario conocer el nivel de consumo de alimento de los animales. Cuanto mayor es la cantidad de alimentos que los animales consumen, mayor es la productividad; debido a que este incremento de consumo influye positivamente en la eficiencia de los procesos productivos y como consecuencia los costos de mantenimiento del sistema productivo descienden proporcionalmente a medida que el animal produce más (Swain *et al.*, 2013). Sin embargo, la medición de consumo de alimento en animales al pastoreo es muy dificultoso debido a los múltiples factores que influyen en este parámetro; factores relacionadas a la especie, la pastura, el manejo y el medio ambiente (Macon *et al.*, 2003).

La mayor parte de la información disponible sobre consumo de alimento en alpacas proviene de estudios comparativos con ovinos realizados por San Martín (1987); dichos estudios se llevaron a cabo bajo condiciones estabuladas donde se observó que las alpacas y llamas tienen un consumo de materia seca (MS) diario de 1.8% y 2.0 % del peso vivo, respectivamente; ambos consumos son menores al de los ovinos, quienes registraron en promedio consumos de MS de 2.8 % del peso vivo (Van Saun, 2006). La menor tasa de consumo observada en alpacas en comparación con los rumiantes es el resultado de varios factores asociados. Factores como un mayor tiempo de retención de partículas en el tracto digestivo y un tamaño corporal mayor relativo al menor requerimiento de energía de las alpacas; entre otras características adaptativas nutricionales (Cebra *et al.*, 2014).

El **tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo** de la alpaca es mayor que en otros rumiantes. Estudios comparativos entre alpacas y ovinos se encontró un mayor tiempo de retención del alimento en alpacas 50.3 h mientras que en ovinos 43.2 h. Así mismo, Sponheimer *et al.* (2003), encontraron que las alpacas retienen partículas grandes durante un período más largo en el tracto digestivo, en comparación con otras especies como los vacunos, caprinos, equinos y conejos (Cebra *et al.*, 2014).

El mayor tiempo de retención del alimento en las alpacas tiene dos consecuencias importantes: (1) la mejor utilización de los constituyentes de la pared celular, y (2) la limitación de la capacidad de los compartimentos restringiendo el consumo. La posibilidad, que las partículas de alimento salgan del estómago, es principalmente por su densidad y tamaño; sin embargo, la densidad de las partículas es más importante que el tamaño. Las partículas más grandes tienen baja densidad y, por lo tanto, se retienen durante un período más prolongado en el C1 y C2. Esta retención prolongada de partículas más grandes facilita la continua degradación microbiana de la celulosa en alpacas (Cebra *et al.*, 2014).

La tasa de pasaje de la fase líquida y partículas pequeñas de las alpacas en el C1 y C2 es más rápida comparada con otras especies como los ovinos, vacunos y caballos. Por ejemplo, en llamas fue 10.4 %/h que en ovinos 7.7 %/h; información parecida fue observada en camellos y novillos de la raza Cebú, donde el flujo de la fase líquida fue más rápido en el estómago de camellos. Esta tasa de pasaje de la fase líquida más rápida se debe a la alta relación entre la cantidad de saliva deglutida y el tamaño del C1 y C2 (Van Saun, 2006 y Cebra *et al.*, 2014).

Las diferencias en el tiempo de retención de las fases líquida y sólida en el estómago de las especies poligástricas no son aun claramente entendidas. Se presume que en alpacas y ovinos la función del canal entre C2 y C3 (retículo y omaso en ovinos) y la motilidad del C2 (retículo en ovinos) son los principales responsables de este transporte selectivo de la fase líquida y sólida. Existen también, mecanismos similares de succión y la habilidad para separar partículas que pasan a través del canal C3 en alpacas (canal omasal en ovinos). Sin embargo, en el estómago de ambas especies existen diferencias, ya sean morfológicas, histológicas y de motilidad estomacal. Por lo tanto, la tasa de pasaje a través

del tracto digestivo en ambas especies sería reflejo de sus marcadas diferencias en la anatomía y fisiología digestiva (Van Saun, 2006 y Cebra *et al.*, 2014).

Otra característica importante en esta especie es la **digestibilidad**; numerosas pruebas comparativas de digestibilidad *in vivo* han sido llevadas a cabo entre alpacas y rumiantes encontrándose notables diferencias; en las que se observaron mayores coeficientes de digestión en alpacas que en ovinos. La calidad de los alimentos usados en estos experimentos son la razón que se atribuye a estas diferencias encontradas en los coeficientes de digestión entre estas especies. Pruebas con dietas suministradas con menos de 7.5% y mayor de 10.5% de proteína cruda (PC), se encontró que las dietas que contienen menos del 7,5% de PC, la digestibilidad resultó ser más alta y más favorable para las alpacas, mientras que no se observó diferencia entre las especies en las dietas con niveles superiores al 10.5% de PC (Van Saun, 2006 y Cebra *et al.*, 2014).

Estos datos sugieren que las alpacas son más eficientes que los ovinos en la digestión de alimentos de mediana y baja calidad. Esta mayor eficiencia digestiva en las alpacas se relaciona con el mayor tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo; la mayor frecuencia de contracciones en el estómago y ciclos de rumia; la más amplia relación flujo salival y tamaño del estómago; la presencia de sacos glandulares en el estómago y la aptitud de los camélidos de mantener una mayor concentración de amoníaco en el C1 y C2 comparado con el ovino que proveerían más nitrógeno disponible para la síntesis microbiana, mejorando la digestibilidad. Estas peculiaridades del sistema digestivo les permitirían una más eficiente maceración, mezclado y absorción de la digesta (Van Saun, 2006 y Cebra *et al.*, 2014).

En producción animal, a menudo el bajo consumo se relaciona con una baja tasa de producción debido a que una gran parte de la energía de los alimentos se desvía para cumplir con el requerimiento de mantenimiento, lo que resulta en una mala conversión del alimento. En contraste a la teoría, el bajo consumo observado en alpacas al pastoreo en su ambiente natural adverso, con poca disponibilidad de forraje de mala calidad durante la mayor parte del año es una adaptación importante que, junto con una mayor capacidad digestiva, proporciona una ventaja competitiva (Van Saun, 2006 y Cebra *et al.*, 2014).

2.2. Métodos de determinación del consumo de alimento:

Los métodos de estimación del consumo de alimento en condiciones controladas son relativamente sencillos. Gran parte del trabajo experimental aplicado se ha basado en la medición del consumo de alimentos en pesajes individuales de alimentos a intervalos de 24 h, pero a menudo en períodos más cortos y en otras ocasiones más largos. Estas mediciones se expresan como: consumo de alimento es igual a la cantidad de alimento ofrecido menos la cantidad de alimento rechazado. El método de pesaje de 24 horas no es aplicable a la situación de pastoreo, ni es apropiado para la estimación del consumo de forraje individual de animales mantenidos en grupo y es aún una incógnita para los investigadores (Forbes, 2007 y Cottle, 2013).

En situaciones en las que no es posible medir el consumo de forraje directamente, como al pastoreo o en alojamiento en grupo; los métodos desarrollados y empleados hasta la fecha toman tiempo, trabajo y costo (Forbes, 2007 y Decruyenaere *et al.*, 2009). Por lo que no es posible referirse a una determinación exacta del consumo, sino que es más correcto hablar de un índice estimativo de la cantidad de forraje consumido en condiciones de pastoreo, existiendo sin embargo técnicas más exactas que otras. Estos métodos se clasifican en forma muy general como directos e indirectos (Haro, 2002).

Los métodos directos se refieren específicamente a la estimación del consumo bajo condiciones controladas en jaulas individuales y a la estimación por el método telemétrico basado en transmisiones de presión mediante unas “botas” especiales, que detectan los cambios de peso del animal (Minson, 1990). Los métodos indirectos incluyen estimaciones de consumo utilizando medidas agronómicas, parámetros del comportamiento animal y estimación de la porción no digerible del forraje y producción fecal total (Haro, 2002 y Forbes, 2007).

Las determinaciones de consumo utilizando medidas agronómicas consisten básicamente en la realización de cortes del forraje antes y después del pastoreo y el diferencial representa la cantidad consumida por el animal (Minson, 1990). Su desventaja es que no considera los efectos asociados con el pisoteo, la selectividad del animal y el crecimiento del forraje, por lo que los resultados obtenidos mediante esta metodología son dudosos (Haro, 2002).

Un segundo método indirecto para estimar el consumo de forraje, incluye la utilización de ciertos parámetros de comportamiento como el tiempo de pastoreo, número de bocados por unidad de tiempo y el tamaño del bocado (Minson, 1990 y Forbes, 2007); pero los datos obtenidos por este método presentan coeficientes de variación hasta de un 50%, lo que indica la baja precisión del mismo (Haro, 2002).

La técnica que se ha considerado como estándar por ser la más adecuada en términos de precisión, es la que contempla la relación entre la cantidad total de heces producida por unidad de tiempo y la porción no digerible de la ingesta (Heces/1-Digestibilidad). El grado de exactitud del método dependerá de la precisión con que se determine la producción diaria de heces y la digestibilidad de la dieta seleccionada por el ganado (Haro, 2002). Este método se realiza a través del uso de bolsas colectores de heces y de animales fistulados esofágicamente, a pesar de sus desventajas relacionadas con el tiempo y costo; pero en la actualidad se realizan también mediante el uso de marcadores; sustancias indigestibles, que están presente en los alimentos o pueden ser agregados a ellos; denominados marcadores internos o externos (Haro, 2002 y Forbes, 2007). El conocimiento de la concentración del marcador en el alimento y la medición de su concentración en las heces permite medir la producción total de heces y digestibilidad. Alternativamente, agregar un peso conocido de un marcador a la dieta diaria, seguido de la medición de su concentración en las heces, permite calcular el consumo de forraje, siempre que se conozca la digestibilidad (Forbes, 2007).

2.3. Métodos de estimación de la excreción fecal total

De acuerdo a Mayes y Dove (2000) para estimar excreción fecal total de mamíferos herbívoros al pastoreo en investigación se usan dos métodos. La medición directa es por colección de la excreción fecal total por bolsas colectoras y la estimación indirecta es por marcadores.

2.3.1. Método de medición directa de la excreción fecal total

El método directo de medición de la excreción fecal total se realiza por colección total de heces por bolsas sujeta al cuerpo del animal mediante arneses. Las ventajas de este método de medición es que es relativamente simple y se requieren pocos métodos de

laboratorio. Existen números diseños de arneses y bolsas colectoras; sin embargo, ningún tipo específico de arnés parece tener ventajas sobresalientes (Greenhalgh, 1982).

Esta técnica es apropiada principalmente para animales machos. Si las heces son colectadas en animales hembras, se debe usar un separador de orina para prevenir la contaminación de las heces, particularmente con bovinos. Con ovejas hembras es posible la colección usando bolsas de malla, siempre que las heces producidas sean relativamente secas y compactas (Hammeleers, 2002 y Greenhalgh, 1982). Los arneses, las bolsas colectoras y el separador deben estar fijados al animal varios días antes del periodo de medición. Este periodo de adaptación permite que se realice ajustes para asegurarnos que los arneses queden fijados y no haya pérdida de heces de las bolsas en el periodo de la experimentación (Greenhalgh, 1982).

El número de días necesarios de colección de heces y de animales, varía de acuerdo a las condiciones del estudio. Se recomienda que la colección de heces tenga un período de adaptación de 7 a 10 días y un período de colección de 5 a 7 días como mínimo; este tiempo sería el tiempo mínimo para obtener una medición razonable de la producción de heces y reflejar cambios que podrían ocurrir en la digestibilidad y composición del forraje consumido. En cuanto al número de animales para obtener una información con buen grado de confiabilidad son necesarios como mínimo 4 a 6 animales (Burns *et al.*, 1991).

La frecuencia con la que se toma muestra de las heces colectadas debe ser la misma respecto al momento en que las bolsas colectoras son vaciadas el volumen de heces frescas producidas. Generalmente es recomendado dos veces al día, pero una vez al día podría ser suficiente cuando el consumo es bajo; en vacas lecheras que producen grandes cantidades de heces podrían ser necesarias tres o cuatro veces al día. Generalmente es necesario un sub muestreo, que consiste en retirar las heces varias veces al día diariamente, debido a las cantidades de heces acumuladas. La sub muestra debe ser mezclado exhaustivamente, hasta lograr una muestra homogénea. Pero cuando el consumo de alimento es bajo o los animales son jóvenes y comen poco alimento sólido, la sub muestra podría no ser necesaria.

Las desventajas de la medición directa de la excreción fecal total (Greenhalgh, 1982; Mayes y Dove, 2000 y Cottle, 2013):

- a) El manejo de la técnica es muy laborioso para una sola persona con doce vacas o 50 ovejas, ya que se requiere cuidar los arneses, cambiar las bolsas colectoras, pesar, muestrear y secar las heces. El método requiere de mucho tiempo y cuidados, por lo que es una técnica costosa y poco práctico.
- b) El pesado y el muestreo de grandes cantidades de heces requieren también grandes cantidades de materiales.
- c) El comportamiento animal y rendimiento podría verse afectado si se usa un diseño inapropiado de los arneses.
- d) La colección de heces en animales hembras es más difícil, ya que se requiere un separador de heces y orina.
- e) La producción de heces podría excederse de las bolsas y dar una subestimación de la excreción fecal total.
- f) El rendimiento de la pastura y la producción animal podría afectarse por el no retorno de heces a la pastura.

Hay pocos estudios en rumiantes al pastoreo, sobre colección total de heces con bolsas colectoras que miden la excreción fecal total (Common *et al.*, 1991 y Ayantunde *et al.*, 1999). Algunos estudios indican que los animales fijados con bolsas colectoras podrían experimentar pérdidas de peso debido al gran esfuerzo de atrapar a los animales dos veces al día y manejar cantidades enormes de muestras. Además, calcularon que cerca de 70 hombres-hora de trabajo de campo son necesarios para un valor individual de heces excretada.

2.3.2. Métodos indirectos para estimar excreción fecal total

Un método alternativo para estimar la excreción fecal total de manera indirecta es a través del empleo de materiales indigestibles que pueden ser orgánicos o inertes a manera de marcadores internos o externos (Titgemeyer, 1997). Los criterios que se deben tener en cuenta para ser un marcador ideal; deben ser (Jagger *et al.*, 1992 y Titgemeyer *et al.*, 2001):

- a) El marcador debe ser cuantitativamente recuperable en las heces, no debe ser absorbido ni retenido anormalmente en el tracto digestivo del animal; se debería obtener 100% de recuperación; pero si la recuperación fecal del marcador es diferente de 100% este también podría ser usado, siempre en cuando la diferencia sea constante.
- b) Ser de flujo paralelo con la digesta.
- c) Ser debidamente analizable por métodos físicos o químicos.
- d) Estar presente en solamente pequeñas cantidades en la dieta original.
- e) No debe afectar o ser afectado por el tracto digestivo o la población microbiana.
- f) No debe ser tóxico.

Usando un marcador, la excreción fecal total se estima mediante la siguiente expresión (Owens y Hanson, 1992).

$$\text{Excreción fecal total diaria (g)} = \frac{\text{Peso del marcador suministrado (mg/día)}}{\text{Concentración del marcador en las heces (mg/g)}}$$

2.4. Marcadores internos

Los marcadores internos están presentes naturalmente en los alimentos, forman parte de los tallos y hojas de las plantas (Bullock *et al.*, 2001). Por lo tanto, la recuperación fecal de los marcadores internos es influenciados directamente por la dieta. Los más comunes usados en estudios de nutrición son las cenizas ácido insolubles, los n-alcanos de cadena larga, la lignina y la fibra detergente ácida indigestible; aunque este último no es un marcador interno ideal debido al recojo incompleto en las heces. Son varios los marcadores internos; sin embargo, para ser usados en estimación de producción fecal total en rumiantes al pastoreo se tienen dificultades ya que la ingestión del marcador es desconocida, algunas veces su concentración es mayor en las heces que en la dieta y su condición química no siempre es estable (Titgemeyer, 1997). Dos Santos y Petit, (1996) usando cenizas ácido insolubles para estimar excreción fecal en ovejas estabuladas y alimentadas con ensilado; obtuvieron resultados muy variables y una relación no significativa con la medición directa de excreción de heces por bolsas colectoras.

2.5. Marcadores externos

Los marcadores externos son materiales que no se encuentran naturalmente en el alimento, no son digeribles, no son tóxicas, son totalmente recuperables y de fácil cuantificación (Maynard *et al.*, 1992 y Burns *et al.*, 1994). Estos marcadores externos son utilizados con diferentes propósitos, tales como: la estimación de la digestibilidad, la excreción fecal total, el consumo y la de tasa de pasaje a través del tracto digestivo (Burns *et al.*, 1991).

El uso de los marcadores externos es el método más común para estimar excreción fecal total en rumiantes al pastoreo. El marcador externo debe ser administrado al animal en dosis conocida, luego se hace un muestreo periódico de las heces y se mide la concentración del marcador. El grado de confiabilidad de esta estimación depende principalmente de la cantidad de marcador externo recuperado en las heces. Algunos marcadores externos no sólo no se recuperan totalmente, sino que presenta variaciones diurnas de excreción, las cuales tienen efecto directo sobre la concentración del marcador en las heces y por ende en los valores de estimación de excreción fecal total (Burns *et al.*, 1991). Owens y Hanson (1992) reportaron que las dosis irregulares y el patrón alimenticio causarían esta variación diurna de la concentración fecal del marcador.

Para mitigar estos problemas se propuso administrar el marcador en cápsulas de gelatina en dos veces diarias o impregnado en papel una vez al día para que la excreción sea uniforme. Sin embargo, un incremento de la frecuencia de dosis causa mayor estrés a los animales y puede por lo tanto alterar el comportamiento de pastoreo. Antes del período de colección de heces es necesario un periodo preliminar de dosificación, para asegurar que las concentraciones de excreción del marcador sean constantes; este periodo debe ser de 4 a 7 días en vacunos.

Se han descrito diferentes vías administración del marcador externo en rumiantes (Owens y Hanson, 1992):

- a) Administración del marcador mezclado homogéneamente con un suplemento,
- b) Administración constante del marcador a los animales por bombas de infusión,

- c) Administración constante del marcador por un dispositivo de liberación controlada en el rumen,
- d) Administración diaria del marcador en cantidades iguales (p.e. con capsulas de gelatina que contengan el marcador ya sea por vía oral o a través de la fistula ruminal).

Los criterios tomados en cuenta para ser usados como marcador externo son los siguientes (Owens y Hanson, 1992):

- a) La recuperación fecal total del marcador;
- b) El tiempo necesario para lograr el equilibrio entre la ingesta y excreción;
- c) El patrón diurno de excreción del marcador;
- d) La estimación de la excreción fecal por el marcador.

Los marcadores externos más utilizados han sido óxido de cromo (Cr_2O_3), óxido férrico (Fe_2O_3), sulfato de plata (Ag_2S) y compuestos de cromo (Cr), cobalto (Co) y elementos raros tales como iterbio (Yb), europio (Eu), disprosio (Dy), oro (Au), cerio (^{144}Ce), escandio (^{46}Sc), circonio (^{95}Zr), lantano (^{140}La), rutenio (^{106}Ru), itrio (Y), etc. (Burns *et al.*, 1994). A pesar que se ha trabajado mucho el uso de marcadores externos radioactivos para estimar excreción fecal total, los marcadores usados con mayor frecuencia en experimentos con rumiantes al pastoreo son el Cr_2O_3 , n-alcanos (Dove y Mayes, 2006) y actualmente se usa también el dióxido de titanio (TiO_2) (Mayes *et al.*, 1995).

Se han probado numerosos tipos de dispositivos para la administración de un marcador externo, pero solamente tres son generalmente usados (Glindemann, 2007):

- a) Capsulas de gelatina con capacidad de 1 g o 10 g que son de uso comercial,
- b) Papeles impregnados con el marcador,
- c) Incorporar el marcador dentro del alimento de los animales, alimentados individualmente con cantidades conocidas (usualmente concentrado).

Sin embargo, se observó que cuando el marcador es administrado en papeles impregnados el flujo del marcador a través del duodeno es más regular, que cuando se administra en capsulas de gelatina. Pero la mayor desventaja del uso de papel impregnado con el marcador es que la dosis no es pesada individualmente (Luginbuhl *et al.*, 1994).

La tasa de excreción del marcador externo es relativa a la tasa de pasaje a través del sistema digestivo, además requiere de un tiempo para alcanzar el equilibrio constante de excreción y este tiempo es influenciado por los niveles del consumo y por las características del alimento (Burns *et al.*, 1994). La toma de muestras de las heces debe ser en el tiempo cuando la concentración del marcador es similar al promedio del valor diario. Normalmente para el muestreo los animales son traídos a corrales y se toman directamente del recto, pero en animales al pastoreo alternativamente también se pueden tomar de la pastura. Comparado con la colección total de heces por arneses y bolsas en el campo; el trabajo en el laboratorio y el estrés de los animales es considerablemente reducido con el uso de los marcadores externos (Dove y Mayes, 2006).

Para minimización el error y la aleatorización del uso de un marcador externo en la estimación de excreción fecal se toman en cuenta algunos criterios (Glindemann, 2007):

- a) Donde sea posible se debe colocar arneses y bolsas colectoras a algunos animales que se encuentran en el experimento, para verificar la tasa de recojo del marcador. La excreción puede ser luego ajustada a la tasa de recojo.
- b) Algunos animales deben ser usados como control, estos no deben ser dosificados con el marcador, pero si determinar el marcador en sus heces y la tasa de recojo del marcador debe ser ajustadas a cero con las mediciones del marcador encontrado en estos animales.
- c) En la preparación de las muestras para su análisis químico, puede haber algunas perdidas del marcador (particularmente en la molienda de la muestra). Se recomienda agregar cantidades conocidas del marcador a heces en blanco y verificar las cantidades de recojo por el método químico.

2.6. Uso de dióxido de titanio como marcador externo

En rumiantes al pastoreo el marcador más usado en este tipo de ensayos ha sido Cr_2O_3 (Titgemeyer, 1997), sin embargo, en múltiples estudios no se encontró una recuperación del 100% y además se encontró grandes variaciones entre animales; su mayor desventaja es su efecto carcinogénico asociado al procedimiento analítico en el laboratorio para su determinación (Delagarde *et al.*, 2010). Adicionalmente, el Cr_2O_3 no ha sido aprobado por el Food and Drug Administration como un aditivo de alimentos (Titgemeyer *et al.*,

2001). Una alternativa el Cr_2O_3 como marcador para estudios de estimación de la excreción fecal, la digestibilidad y el consumo en animales al pastoreo es el TiO_2 (Glindemann *et al.*, 2009 y Sampaio *et al.*, 2011); incluso puede ser agregado legalmente a los alimentos como un colorante aditivo en cantidades que no excedan el 1% del producto final (AAFCO, 1996).

Las cantidades de TiO_2 usadas como marcador externo en estudios de nutrición con ruminantes son de 10 y 2.5 g en bovinos y ovinos, respectivamente, en una o dos veces al día. Siendo las vías de administración la vía oral e intraruminal las más usadas, por medio de cápsulas de gelatina, cápsulas de papel, mezcladas con algún suplemento o con el concentrado (Titgemeyer *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2006; Südekum *et al.*, 1995; Glindemann, 2007; Schaafstra *et al.*, 2012; Lynn, 2014; De Souza *et al.*, 2015; Hellwing *et al.*, 2015; Dini *et al.*, 2017 y Velásquez *et al.*, 2018). En el cuadro 1 se presente también las cantidades usadas en otras especies como porcinos, aves y equinos.

La **recuperación fecal del TiO_2** se ha reportado originalmente en diferentes especies como ratas (Krawielitzki *et al.*, 1987), cerdos (Jagger *et al.*, 1992), aves (Short *et al.*, 1996), bovinos (Titgemeyer *et al.*, 2001) y ovinos (Glindemann, 2007). En la mayoría de los estudios la recuperación es de aproximadamente del 100%. Sin embargo, se discute posibles razones para una recuperación incompleta del TiO_2 en las heces:

- a) Acumulación del TiO_2 en el ciego,
- b) Pérdidas de TiO_2 durante la administración o colección total de heces,
- c) Análisis inadecuados del TiO_2 en heces,
- d) Pérdidas de muestras de heces durante la determinación de TiO_2 (molienda).

Cuadro 1. Especies, cantidades, frecuencia y vía de administración de TiO₂ usado como marcador externo para estudios de nutrición.

Especie	Cantidad y Frecuencia de administración	Vía de administración	Referencias
Porcino	5 g/kg de concentrado, <i>ad libitum</i>	Oral	Jagger <i>et al.</i> (1992)
Porcino	2.53 g/kg de concentrado, <i>ad libitum</i>	Oral	Jacobs <i>et al.</i> (2017)
Porcino	12.5, 25.0 y 37.5 g/kg de concentrado, dos veces al día	Oral	Wang y Adeola (2018)
Broilers	5 g/ Kg de concentrado, <i>ad libitum</i>	Oral	Short <i>et al.</i> (1996)
Broilers	5 g/ Kg de concentrado, <i>ad libitum</i>	Oral	Morgan <i>et al.</i> (2014)
Bovino	10 g en el suplemento, una vez al día	Oral	Titgemeyer <i>et al.</i> (2001)
Bovino	10 g en el concentrado, <i>ad libitum</i>	Oral	Lynn (2014)
Bovino	10 g dos veces al día	Intraruminal, capsulas de papel	De Souza <i>et al.</i> (2015)
Bovino	11 g/kg de concentrado	Oral	Hellwing <i>et al.</i> (2015)
Bovino	10 g una vez al día	Oral, capsulas de gelatina	Dini <i>et al.</i> (2017)
Bovino	15 g en el suplemento, dos veces al día	Oral, capsulas de gelatina	Velásquez <i>et al.</i> (2018)
Bovino y ovino	80 y 10 g, respectivamente, en el alimento, una vez al día	Intraruminal	Südekum <i>et al.</i> (2006)
Ovino	2.5 g dos veces al día	Intraruminal, capsulas de gelatina	Myers <i>et al.</i> (2006)
Ovinos	1.25 g dos veces al día y 2.5 g en el concentrado, una vez al día	Oral	Glindemann (2007)
Ovinos	4 g/kg de concentrado, dos veces al día	Oral	Guzman <i>et al.</i> (2017)
Equino	5 g con un suplemento, una vez al día	Oral	Schaafstra <i>et al.</i> (2012)

Titgemeyer *et al.* (2001) agregaron TiO₂ al forraje y encontraron una recuperación analítica del 100.7% en muestras de heces. Así también, Myers *et al.* (2004) adicionaron diferentes cantidades de TiO₂ en tres fuentes de materia orgánica, una muestra de forraje, una muestra fecal bovina sin Cr₂O₃ y una muestra de heces bovina contaminada con

Cr₂O₃, y encontró recuperaciones analíticas de 96.7, 97.5 y 98.5% para las tres fuentes de materia orgánica, respectivamente.

El **equilibrio de excreción del TiO₂** se mostró que un simple pulso de dosis de TiO₂ es más o menos excretado completamente después de 120 horas por novillos y carneros alimentados de 1.2 a 1.3 veces el mantenimiento; esto indica que equilibrio de ingestión y excreción del TiO₂ es alcanzado dentro de este periodo (Südekum *et al.*, 1995).

En cuanto al **patrón de excreción del TiO₂**, Myres *et al.* (2006) en un estudio con ovejas reportaron una variación diurna en la concentración fecal de TiO₂, administrados con dos dosis de TiO₂ por día. La concentración de TiO₂ en la digesta del duodeno se incrementó luego de la alimentación alcanzando un máximo valor después de las 2 a 4 horas. Estas variaciones indican un mezclado no homogéneo del marcador con el forraje en el rumen; por lo tanto, se podría esperar que la variación diurna de la concentración fecal de TiO₂ ocurre también si el marcador es administrado a los animales como dosis pulsátiles. Hafez *et al.* (1988) administraron TiO₂ en vacunos y se detectaron diferencias en las concentraciones de TiO₂ de las muestras de heces obtenidas por la mañana con las de la tarde. Sin embargo, Jagger *et al.* (1992) en experimentos con cerdos, observaron que no hubo variación en la concentración fecal de TiO₂; en este estudio el marcador fue mezclado homogéneamente en la dieta, la cual sería el responsable para esta observación. A pesar de todos estos estudios de patrón de excreción del TiO₂ no existen estudios sobre su consecuente efecto en protocolos de colección de muestras de heces.

En cuanto a la **determinación de la concentración de TiO₂ fecal** generalmente se determina mediante el procedimiento de ceniza seca o el procedimiento de ceniza húmeda. El procedimiento de ceniza seca consiste en la incineración de la muestra, disolviendo la ceniza cruda con ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado utilizando una placa calefactora y un análisis colorimétrico (Short *et al.* 1996 y Titgemeyer *et al.* 2001). En algunos estudios utilizaron H₂SO₄ concentrado y sulfato de sodio (Na₂SO₄) para elevar el punto de ebullición. El procedimiento de ceniza húmeda, en cambio, consiste en la digestión de la muestra, sin ser incinerada, con H₂SO₄ concentrado utilizando un digestor en bloques y un análisis colorimétrico (Jagger *et al.*, 1992; Myers *et al.*, 2004, 2006; Pina *et al.*, 2009). Ohmori *et al.* (2013) reportó un estudio sobre un procedimiento mejorado de ceniza seca para la detección de dióxido de titanio en heces de ganado cuyo objetivo

fue mejorar el procedimiento de ceniza seca para detectar marcadores externos TiO_2 y Cr_2O_3 en heces de ganado mediante la evaluación del efecto de niveles de aplicación de Na_2SO_4 y el grado de interferencia de Cr_2O_3 en la detección de TiO_2 ; concluyendo que la recuperación de TiO_2 se vio afectada por el nivel de Na_2SO_4 y Cr_2O_3 y además, el TiO_2 en las heces de ganado que contenían Cr_2O_3 se determinó bien mediante el procedimiento de ceniza seca, en el que se utilizaron 5 ml de H_2SO_4 concentrado y 2,5 g de Na_2SO_4 . El procedimiento mejorado de ceniza seca dio resultados fiables equivalentes al procedimiento de ceniza húmeda.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del estudio y Animales experimentales

El presente estudio se realizó en el Bioterio y en el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se utilizaron cuatro alpacas, Huacaya, machos, adultos. Al momento del estudio los animales se encontraban en buen estado de salud, cuyos pesos vivos fueron 48, 53, 50 y 60 kg la alpaca 1, 2, 3 y 4; respectivamente. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales de 1.5 x 1.2 m., donde se les administró alimento y agua *ad libitum*. El alimento administrado se preparó en base a afrecho de trigo, harinilla de cebada, alfalfa molida y un suplemento mineral; con un contenido de 13% de proteína cruda, 25% de fibra cruda y 4.13 Mcal/ kg de energía bruta.

3.2. Desarrollo del experimento

Siete días antes de iniciar el experimento todos los animales pasaron por un período de adaptación a la permanencia en las jaulas individuales, a la dosificación de cápsulas de gelatina con lanza bolos, a la sujeción de arneses y bolsas colectoras de heces.

La distribución de las alpacas en los diferentes tratamientos y períodos evaluados se presenta en el Cuadro 2 y los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

Cuadro 2. Distribución de las alpacas en los diferentes tratamientos y en cada periodo experimental

	Tratamientos			
Alpacas	A1	A2	A3	A4
Periodo 1	TA	TB	TD	TC
Periodo 2	TB	TC	TA	TD
Periodo 3	TC	TD	TB	TA
Periodo 4	TD	TA	TC	TB

A1: animal 1, A2: animal 2, A3: animal 3 y A4: animal 4

TA: tratamiento A, TB: tratamiento B, TC: tratamiento C y TD: tratamiento D

- **Tratamiento A (TA):** 2.5 g de dióxido de titanio (TiO₂) /animal una vez al día (7:00 am) durante 14 d.
- **Tratamiento B (TB):** 1.25 g de TiO₂/animal dos veces al día (7:00 am y 4:00 pm) durante 14 d.
- **Tratamiento C (TC):** 5 g de TiO₂/animal una vez al día (7:00 am) durante 14 d.
- **Tratamiento D (TD):** 2.5 g de TiO₂/animal dos veces al día (7:00 am y 4:00 pm) durante 14 d.

3.3. Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en forma paralela el **método directo**, que consistió en sujetar al cuerpo del animal bolsas colectoras por medio de arneses, donde las heces excretadas se depositaron directamente en las bolsas. Las heces fueron retiradas y pesadas cada 24 horas durante los 14 días de colección de muestras de cada periodo a las cuatro alpacas.

Las muestras de heces se tomaron directamente de las bolsas colectoras a las 0, 48, 96, 144, 192, 240, 288 y 336 horas post inicio a la administración del TiO₂; procurando tomar las heces más frescas, en todos los tratamientos. Las muestras tomadas fueron colocadas en bolsas de polipropileno de primer uso debidamente identificadas y remitidas al Laboratorio para su respectivo análisis.

3.4. Determinación de TiO₂

La concentración de TiO₂ en heces se determinó por el método de cenizas secas propuesta por Ohmori *et al.* (2013); donde las muestras fueron secadas, molidas y se tomó 0.5 g para ser incineradas en un horno mufla L, Nabertherm® a 500°C por 12 h; una vez obtenidas las cenizas, estas cenizas fueron colocadas en tubos de kjeldahl con 2.5 g de sulfato de sodio (Na₂SO₄) y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) y se llevó a digestión por 5 h a 420°C. Culminada la digestión se agregó 10 ml de agua destilada, luego las soluciones se pasaron a fioles para ser completadas a 50 ml, se filtraron a través

del papel filtro 5A y se les agregó peróxido de hidrogeno al 30 %. Finalmente se midió la absorbancia a 408 nm en un espectrofotómetro visible Genesys™ 20, Thermo Scientific.

La curva de calibración se obtuvo con concentraciones conocidas de TiO₂ (0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01 g) a las que se le agregó a muestras de heces de alpacas antes de administrar el marcador y se les realizó en mismo análisis descrito en el párrafo anterior. El análisis obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9929 y el modelo de la ecuación lineal fue $Y=162.8X+0.001$ (anexo 1).

Los parámetros del patrón de excreción del TiO₂ se estimaron utilizando el siguiente modelo matemático (Ruiz y Ruiz, 1990):

$$p(t) = a + b(1 - e^{-ct})$$

Donde:

p: es la excreción estimada del TiO₂ en el tiempo “t”

a: es el intercepto de la curva de la excreción de TiO₂ en el tiempo cero

b: es la máxima excreción del TiO₂ en tiempo

c: es la tasa de excreción del TiO₂.

Según Owens y Hanson (1992), la estimación de producción de heces se determinó, con la siguiente con expresión:

$$\text{Excreción fecal total diaria (g)} = \frac{\text{Peso del marcador suministrado (mg/día)}}{\text{Concentración del marcador en las heces (mg/g)}}$$

Las concentraciones de TiO₂ en las heces se midieron de las muestras tomadas a partir del día 8 de inicio del tratamiento, momento en el que la salida del marcador es constante según el patrón de excreción (anexo 2).

El porcentaje de recuperación de TiO_2 en las heces se determinó por la siguiente expresión (Correa *et al.*, 2009; Velásquez *et al.*, 2018):

$$\text{Porcentaje de recuperación de TiO}_2 \text{ en las heces} = \frac{\text{TiO}_2 \text{ en las heces (g)} \times 100}{\text{TiO}_2 \text{ en el alimento (g)}}$$

3.5. Análisis de la información

El estudio se llevó a cabo bajo un diseño cuadrado latino 4 x 4, con cuatro animales, cuatro tratamientos y cuatro periodos, cada periodo tuvo una duración de 21 d, siete de descanso y 14 de colección de muestras.

El modelo lineal estadístico para este diseño fue el siguiente:

$$Y_{ij}(k) = \mu + P_i + A_j + \tau(k) + \text{error}_{ij}(k) \quad i, j, k=1,2,\dots,n$$

Donde:

- $Y_{ij}(k)$ representa la observación en la unidad experimental correspondiente a la i -ésimo período, j -ésimo animal y k -ésimo tratamiento.
- μ es la media global.
- P_i es el efecto del periodo experimental i
- A_j es el efecto de la alpaca j
- $\tau(k)$ es el efecto del tratamiento k
- $\text{error}_{ij}(k)$ es el error experimental de la unidad experimental i, j

El análisis estadístico de la estimación de la producción de heces con el TiO_2 se analizó mediante el T de STUDENT; para los parámetros de excreción del TiO_2 se realizó a través del análisis de varianza (ANDEVA) para un diseño cuadrado latino y la prueba de Duncan. Los datos fueron analizados por el programa estadístico SAS 9.4, (2013) y en todas las pruebas estadísticas se usó un nivel de significancia de 5%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estimación de la producción total de heces con dióxido de titanio:

La producción de heces estimada con dióxido de titanio (TiO_2) y observada directamente con bolsas colectoras se presentan en el Cuadro 3. Se observa que la producción estimada versus la producción observada para los tratamientos TB, TC y TD tuvieron diferencias significativas.

Sin embargo, en el tratamiento TA no se encontró diferencias significativas de la producción de heces estimada versus la producción observada. De igual manera Titgemeyer *et al.* (2001) encuentra valores numéricamente mayores de la producción de heces estimada con el uso de TiO_2 que con la colección total de heces, pero sin observar diferencia estadística significativa.

En el presente estudio el TiO_2 como marcador sobre estimó la producción de heces en los cuatro tratamientos en porcentajes de 13, 32, 20 y 97%; respectivamente; a diferencia de lo reportado por De Souza *et al.* (2015) quien obtuvo 4% de sobre estimación en vacas lecheras; concluyendo que el TiO_2 estima valores de producción de excreción fecal con gran precisión. Por lo contrario, Glindemann *et al.* (2009) en ovejas con administración de TiO_2 de una y dos veces al día encontró subestimaciones de la producción de heces; presumiendo que sus resultados se debieron a recuperaciones del marcador significativamente mayor al 100% y que con el tratamiento con mayor frecuencia de administración del marcador estimó con mayor precisión la producción fecal.

Cuadro 3. Promedio de producción de heces estimada con dióxido de titanio y observada en alpacas en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14

(n=7)

Tratamientos	Producción estimada (g)	Producción observada (g)	Probabilidad
	± DE	± DE	
TA (2.5 g)	533.12 ± 71.34 ^a	469.51 ± 74.07 ^a	0.127710
TB (1.25 g x 2)	543.86 ± 97.25 ^a	413.28 ± 99.27 ^b	0.001214
TC (5.0 g)	537.23 ± 54.49 ^a	445.59 ± 29.12 ^b	0.036063
TD (2.5 g x 2)	679.88 ± 114.98 ^a	344.89 ± 73.67 ^b	0.000030

^{a,b}: Superíndices diferentes dentro de fila indican diferencia estadística

± DE: Desviación estándar

Al respecto la literatura menciona que la precisión del método con el uso de marcadores para estimar la producción de heces podría ser idéntica a la precisión del método por colección total con bolsas colectoras si hubiera recuperaciones completas del marcador y que si hay una recuperación incompleta del marcador la precisión del método podría diferir. Por lo tanto, la colección total sigue siendo el mejor método para determinar la producción de heces (Barton y Houston, 1991). Además, la variabilidad en la estimación de la producción total de heces con marcadores externos depende del marcador empleado, el método de administración del marcador, la frecuencia de colección de heces, y el método de colección de heces y principalmente el momento en el que se toma de muestra, debido la variación diurna de la excreción fecal del marcador (Lascano, 1990 y Dove y Mayes, 1991).

4.2. Porcentaje de recuperación de dióxido de titanio:

El porcentaje de recuperación de TiO_2 , durante el periodo de evaluación en los cuatro tratamientos, se presenta en el Cuadro 4. Se observa mayor recuperación en los tratamientos TA, TB y TC; en 90, 82 y 78 %; respectivamente, siendo iguales entre estos; en comparación al TD que se obtuvo una recuperación de 52 %.

En estudios con bovinos y ovinos al pastoreo los porcentajes de recuperación de TiO_2 fueron bastante variables, pero se recuperó aproximadamente el 100 % (Glindemann *et al.*, 2009; Titgemeyer *et al.*, 2001). Así también en aves se encontró un porcentaje de recuperación del 97.5% (Peddie *et al.*, 1982).

Los mayores porcentajes de recuperación mayores al 100 % de TiO_2 observados en animales al pastoreo, se deba posiblemente a que los animales estarían ingiriendo, voluntaria o involuntariamente, cantidades extras de TiO_2 del suelo (Glindemann *et al.*, 2009 y Titgemeyer *et al.*, 2001). Existe información de concentraciones de 2.1 a 2.4 mg de Titanio por gramo de suelo seco; esto estaría influenciando los porcentajes altos de recuperación de TiO_2 .

Cuadro 4. Porcentaje de recuperación de dióxido de titanio en heces de alpacas

TRATAMIENTOS				
DÍAS	TA (2.5 g)*	TB (1.25 g x 2)*	TC (5.0 g)*	TD (2.5 g x 2)*
2	77	82	83	44
4	74	82	72	54
6	99	86	125	47
8	82	82	73	48
10	97	73	72	53
12	83	88	73	62
14	107	83	53	46
Promedio	90 ± 13^a	82 ± 5^a	78 ± 22^a	52 ± 6^b

^{a,b}: Superíndices en fila indican diferencia estadística significativa

*: g de TiO₂

Sin embargo, en aves rapaces se obtuvieron bajos porcentajes de recuperación de TiO_2 , de aproximadamente 52 a 78 % (Barton y Houston, 1991), cuyos valores son similares a lo obtenido en el tratamiento TD del presente estudio. Múltiples causas podrían explicar los bajos porcentajes de recuperación de TiO_2 en alpacas; causas como:

- Un comportamiento particular que tienen estos animales cuando están enojadas que es el de escupir, ya sea por disputa del alimento, por el manejo que se les realiza (recorte de uñas, esquila, etc.) o por el momento la cópula en el caso de las hembras (Ponzoni, 1996; Gonzáles, 2002);
- Que el TiO_2 esté saliendo en otro producto metabólico de desecho, como la orina (Barton y Houston, 1991);
- Que el TiO_2 tome más tiempo de lo esperado para quedar en equilibrio;
- Que el TiO_2 esté pasando a través del tracto gastro-intestinal en pulsos concentrados y se haya tomado las muestras en el momento en que el marcador estuvo en bajas concentraciones;
- Que el TiO_2 tenga mayor tiempo de retención en el tracto digestivo, aunque no necesariamente sea absorbido;
- Que las pérdidas de TiO_2 se hayan dado durante la manipulación de las muestras como el secado, el molido, la incineración y la disolución.

El criterio de recuperación de un marcador debe ser cerca al 100% para ser considerado marcador nutricional ideal (Owens y Hanson, 1992); en el presente estudio el TiO_2 en las alpacas no estaría cumpliendo este criterio ya que el mayor porcentaje de recuperación observada fue en promedio 90%. Sin embargo, mencionan también que si la recuperación fecal del marcador es diferente de 100% también podría ser considerado como marcador, siempre y cuando la diferencia sea constante.

4.3. Parámetros de excreción de dióxido de titanio:

Los parámetros del patrón de excreción de TiO_2 en heces de alpacas se presentan en el Cuadro 5. Se observa que los parámetros a, c, T medio y T (a+b) no fueron diferentes, entre los tratamientos evaluados. El parámetro b fue mayor en TC y TD frente a TA y TB. Siendo iguales entre TC y TD y TA y TB.

La excreción inicial de TiO_2 fue bastante baja, muy cercana a cero, esto demuestra que las heces de las alpacas no presentan cantidades importantes del marcador y la única fuente de TiO_2 fue la dosificación que se realizaba.

La tasa de excreción del TiO_2 en las heces, fue en promedio 0.07 g/h (valor de c) sin diferencia estadística entre tratamientos; esto posiblemente por el tipo de dieta que recibieron las alpacas; dieta que fue a base de harina de alfalfa, afrecho y harinilla de cebada. Mientras que en el trabajo de Glindemann *et al.* (2009) con ovinos usó una dieta a base de concentrado, henos y pasturas naturales de la estepa Mongoliana.

El tiempo necesario para la excreción de la mitad de la concentración de TiO_2 (valor de T medio) en las heces fue aproximadamente de 10.08 h. Ya en uno de los primeros estudios con marcadores para estimar excreción fecal en ovejas al pastoreo y óxido de cromo como marcador se reportó valores similares del tiempo de excreción del marcador en heces al T medio del presente estudio; la aparición del marcador en las heces en las primeras 05-09 h después de la administración del marcador, aumentando rápidamente y llegando a un pico de concentración a las 10-18 h. Así mismo, Glindemann *et al.* (2009) en ovejas encontró valores similares, 09 h para la máxima concentración de TiO_2 en las heces. A diferencia de Myers *et al.* (2006) quienes observaron un incremento en la concentración máxima de TiO_2 en el contenido duodenal a las 02-04 h después de la administración oral del marcador.

Cuadro 5. Parámetros (promedio ± DE) del patrón de excreción de dióxido de titanio en heces de alpaca

Tratamiento	a (g x 10⁻⁶)	b (g x 10⁻⁴)	c (g x 10⁻⁵h⁻¹)	T medio (h)	T (a+b) (h)
TA (2.5 g)	13 ± 23 ^a	47.93 ± 5.23 ^a	7325 ± 2.2 ^a	9.46 ± 0.0027 ^a	192 ^a
TB (1.25 g x 2)	5 ± 9 ^a	48.09 ± 6.27 ^a	7194 ± 249 ^a	9.64 ± 0.34 ^a	192 ^a
TC (5.0 g)	38 ± 50 ^a	98.88 ± 4.64 ^b	6720 ± 990 ^a	10.52 ± 1.81 ^a	204 ^a
TD (2.5 g x 2)	12 ± 24 ^a	95.57 ± 15.99 ^b	6666 ± 115 ^a	10.69 ± 2.23 ^a	216 ^a

a: Excreción inicial de TiO₂

b: Excreción potencial de TiO₂

c: Tasa de excreción de TiO₂

T medio: Tiempo necesario para la excreción de la mitad de la concentración de TiO₂

T (a+b): Tiempo en el que se alcanzó el equilibrio constante de excreción de TiO₂

^{a,b}: Superíndices diferentes dentro de columna indican diferencia estadística

El tiempo en el que se alcanza el equilibrio constante de excreción (valor de T_{a+b}) fue de 201 h, aproximadamente 8 días, desde el inicio de la administración de TiO_2 . Este resultado difiere a lo reportado por Glindemann *et al.* (2009) quien menciona que son suficientes 5 días para lograr el equilibrio de excreción de TiO_2 . El mayor T_{a+b} obtenido podría ser atribuido a las particularidades fisiológicas digestivas de las alpacas, de tener una tasa de retención lenta del alimento en el tracto digestivo (Cebra *et al.*, 2014).

El tiempo en el que se alcanza el equilibrio constante de excreción podría deberse a que la calidad de las pasturas tiene un efecto sobre el patrón de excreción del marcador en las heces; los tiempos más largos de excreción se registran en alimentos más fibrosos (pasto pobre, heno) y los tiempos más cortos en pastos de buena calidad o concentrados, además que la excreción del marcador es ligeramente más rápida cuanto mayor es el nivel de ingesta y como se sabe las alpacas presentan menor consumo de alimento que los ovinos. Por lo tanto, esto podría explicar nuestros resultados de tiempo de equilibrio de excreción constante del TiO_2 .

En el presente estudio los parámetros del patrón de excreción de TiO_2 en heces no se vio influenciado por la frecuencia de administración del marcador, de una y dos veces al día. Así también, Myers *et al.* (2006) en ovejas no observó variación diurna notable en el patrón de excreción fecal de TiO_2 , explicando que pudo deberse a una mayor frecuencia de dosificación del marcador (dos veces al día). Sin embargo, se dice que existe un típico patrón diurno de excreción del TiO_2 (Glindemann *et al.*, 2009) y en un estudio con vacunos se observó variación diurna del patrón de excreción cuando fueron dosificadas una o dos veces al día; pero la variación diurna fue menor cuando las vacas fueron dosificadas dos veces al día (Prigge *et al.*, 1981).

Las alpacas, para su alimentación dependen del 100% de las praderas naturales altoandinas; los estudios sobre consumo y digestibilidad, bajo las condiciones en las que se desarrolla esta especie son bastante reducidos, por diversas las razones. No existe ningún estudio sobre el uso de marcadores nutricionales en alpacas; el único estudio existente es el que uso etilendiaminotetraacetato cromo para estimar tasa de pasaje comparándola con ovinos (San Martín, 1987). Por lo que, este trabajo es el primer acercamiento al uso de un marcador, como el TiO_2 , para estimar la producción de heces en alpacas.

El uso TiO_2 en alpacas, presenta una oportunidad para realizar diversos estudios y generar información necesaria para la evaluación nutricional de las pasturas naturales, determinar el consumo voluntario de las alpacas y con esta información realizar un manejo apropiado de la pradera natural.

El estudio del patrón de excreción del TiO_2 , en alpacas, se hace necesario debido a las características particulares anátomo-fisiológicas de esta especie, como su tasa de retención lenta del alimento en el tracto digestivo, su alta digestibilidad de alimentos de baja calidad, su alta capacidad de reciclaje de nitrógeno, su menor requerimiento nutricional que le permiten sobrevivir en un estado de homeostasis en ambientes de escasez de alimento, su menor consumo de alimento, su comportamiento altamente selectivo, su capacidad de adaptación a las praderas alto-andinas, caracterizadas por su baja disponibilidad de forraje y contener nutrientes altamente diluidos por carbohidratos estructurales de difícil digestión (Cebra *et al.*, 2014 y Van Saun, 2003); que podrían estar influyendo en la variabilidad de los resultados obtenidos en el presente estudio.

Por otro lado, el modelo matemático utilizado en el presente estudio fue apropiado para establecer el patrón de excreción del TiO_2 en alpacas. Existe escasa información del uso de modelos matemáticos para determinar los parámetros del patrón de excreción fecal de TiO_2 . La excreción de un marcador en las heces vs tiempo post dosis se ajusta a un modelo bi exponencial con dependencia del tiempo (Ruiz y Ruiz, 1990), este permite estimar la concentración inicial del marcador en el tracto y la tasa de pasaje de los residuos no digeridos. En el presente estudio se utilizó el modelo tipo “curva de crecimiento” $p=a+b(1-e^{-ct})$, para el mejor entendimiento del patrón de excreción del TiO_2 ; cuya efectividad dependerá de cuan cercanos al valor real se encuentran los estimados de los parámetros que se proveyeron al momento de determinar los parámetros (Lascano, 1990).

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se llevó acabo el presente experimento con alpacas se concluye que:

1. El uso de TiO_2 como marcador nutricional para la estimación de excreción fecal total en alpacas es posible con la cantidad de 2.5 g de TiO_2 /animal, administradas una vez al día; ya que estima similar a la medición con bolsas colectoras.
2. Las cantidades de 1.25 x 2 g de TiO_2 /animal, administradas dos veces al día; 5 g de TiO_2 /animal, una vez al día y 2.5 x 2 g de TiO_2 /animal, dos veces al día sobrestiman la excreción fecal total en comparación de la medición con bolsas colectoras.
3. El equilibrio de excreción de TiO_2 se alcanza aproximadamente a los ocho días post el inicio de la administración del marcador de los 14 días que duro el tratamiento; tiempo óptimo para estimar producción de heces total.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar experimentos en alpacas con el uso de dióxido de titanio (TiO_2) como marcador para estimar excreción total de heces en estudios de digestibilidad y consumo; tanto en condiciones estabuladas como en condiciones naturales de pastoreo.
- Diseñar estudios con mayor número de animales y con dietas que contengan diferentes características físicas a las que se usó en el presente estudio.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAFCO. 1996. Association of American Feed Control Officials: Official Publication. The Association, Atlanta, GA. Blaxter (1963).

AYANTUNDE, AA; FERNÁNDEZ-RIVERA, A; HIERNAUX, P; VAN KEULEN, H AND UDO, HMJ. 1999. Forage intake and feeding behaviour of day and/or night grazing cattle in Sahelian rangelands. In Regulation of feed intake (eds. Heide, D van der, Huisman, EA, Kanis, E, Osse, JWM, Verstegen, MWA). Proceedings 5th Zodiac Symposium, Wageningen.-Wallingford: CABI, 1999. p197-202.

Base SAS® 9.4. 2013. Procedures Guide Statistical Procedures Second Edition

BARTON, NW y HOUSTON, DC. 1991. The use of titanium dioxide as an inert marker for digestion studies in raptors. Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology, vol. 100, no 4, p. 1025-1029.

BULLOCK, JM., FRANKLIN, J., STEVENSON, MJ., SILVERTOWN, J., COULSON, SJ., GREGORY, SJ and TOFTS, R. 2001. A plant trait analysis of responses to grazing in a long-term experiment. Journal of Applied Ecology 2001 38, 253–267.

BURNS, JC., POND, KR., & FISHER, DS. 1991. Effects of grass species on grazing steers: II. Dry matter intake and digesta kinetics. Journal of animal science, 69(3), 1199-1204.

BURNS, JC., POND, KR., & FISHER, DS. 1994. Measurement of forage intake. Forage quality, evaluation, and utilization, (foragequalityev), 494-532.

CEBRA, C; ANDERSON, D; TIBARY, A; VAN SAUN, R y JOHNSON, L. 2014. Llama and Alpaca Care Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health. Estados Unidos: Elsevier.

COTTLE, DJ. 2013. The trials and tribulations of estimating the pasture intake of grazing animals. *Animal Production Science*, 53(11), 1209-1220.

COMMON, TG; HUNTER, EA; FLOATE, MJS; EADIE, J y HODGSON, J. 1991. The long-term effects of a range of pasture treatments applied to three seminatural hill grassland communities. 1. Pasture production and botanical composition. *Grass and Forage Science*, 46(3), 253-263.

CORREA, HJ; PABÓN, ML Y CARULLA, JE. 2009. Estimación del consumo de materia seca en vacas Holstein bajo pastoreo en el trópico alto de Antioquia. *Livestock research for rural development*, 21 (4). En: <http://www.lrrd.org/lrrd21/4/corr21059.htm>.

DELAGARDE, R., PEREZ-RAMIREZ, E., & PEYRAUD, JL. 2010. Ytterbium oxide has the same accuracy as chromic oxide for estimating variations of faecal dry matter output in dairy cows fed a total mixed ration at two feeding levels. *Animal feed science and technology*, 161(3-4), 121-131.

DE SOUZA, J; BATISTEL, F; WELTER, KC; SILVA, MM; COSTA, DF y SANTOS, FAP. 2015. Evaluation of external markers to estimate fecal excretion, intake, and digestibility in dairy cows. *Tropical animal health and production*, 47(1), 265-268.

DECRUYENAERE, V., BULDGEN, A., & STILMANT, D. 2009. Factors affecting intake by grazing ruminants and related quantification methods: a review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(4), 559-573.

DINI, Y., CIGANDA, VS., & CAJARVILLE, C. 2017. Estudio de la variabilidad de la técnica de estimación de consumo en pastoreo a través del marcador externo Dióxido de Titanio. *Veterinaria (Montevideo)*, 53(208), 1-11.

DOS SANTOS, G. T., & PETIT, H. V. 1996. Prediction of total fecal output in sheep fed silage using the Captec chrome controlled-release capsule. *Small Ruminant Research*, 20(3), 223-227.

DOVE, H y MAYES, RW. 1991. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. Australian journal of agricultural research, vol. 42, no 6, p. 913-952.

DOVE, H., & MAYES, R. W. 2006. Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. Nature protocols, 1(4), 1680.

FORBES, JM. 2007. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. (Ed.).Cabi. p. 1-11.

GREENHALGH, JFD. 1982. An introduction to herbage intake measurements. In: J. D. Leaver (Ed). Herbage Intake Handbook. The British Grassland Society. p 38-44.

GLINDEMANN, T. 2007. Effect of grazing intensity on feed intake and productivity of sheep in the Inner Mongolian steppe. Tesis Doctoral. Christian-Albrechts Universität Kiel.

GLINDEMANN, T; TAS, BM; WANG, C; ALVERS, S y SUSENBETH, A. 2009. Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. Animal Feed Science and Technology, 152(3-4), 186-197.

GONZÁLEZ, J. 2002. Etología de camélidos y arte rupestre de la Subregión río Salado (norte de Chile, II Región). Estudios atacameños, (23), 23-32.

GUZMAN, AEC., CORONA, L., CASTREJON, FP., ROSILES, RM & GONZALEZ, MR. 2017. Evaluation of chromium oxide and titanium dioxide as inert markers for calculating apparent digestibility in sheep. Journal of applied animal research, 45(1), 275-279.

HAFEZ, S; JUNGE, W y KALM, E. 1988. Estimate of digestibility in dairy cows using an indicator method in comparison to the Hohenheimer feed value test. Archiv fur Tierernahrung, 38(10), 929-945.

HARO, JM. 2002. Consumo voluntario de forraje por rumiantes en pastoreo. Acta universitaria, 12(3), 56-63.

HAMMELEERS, A. 2002. Métodos para estimar consumo voluntario de forrajes por rumiantes en pastoreo. En <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/NUTRICION/TEORICOS/2010.Material%20de%20lectura%20consumoIII.pdf>

HELLWING, ALF., LUND, P., WEISBJERG, MR., OUDSHOORM, FW., MUNKSGAARD, L., & KRISTENSEN, T. 2015. Comparison of methods for estimating herbage intake in grazing dairy cows. Livestock Science, 176, 61-74.

JACOBS, BM., PATIENCE, JF., LINDEMANN, MD., STALDER, KJ., & KERR, BJ. 2017. Disappearance and appearance of an indigestible marker in feces from growing pigs as affected by previous-and current-diet composition. Journal of animal science and biotechnology, 8(1), 32.

JAGGER, S; WISEMAN, J; COLE, DJA y CRAIGON, J. 1992. Evaluation of inert markers for the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. British Journal of Nutrition, 68(3), 729-739.

KRAWIELITZKI, K; SCHADEREIT, R; BORGMANN, E y EVERS, B. 1987. Use of $^{51}\text{Cr}2\text{O}_3$ and TiO_2 as markers for the determination of passage rate and protein digestibility in rats. Archiv fur Tierernahrung, 37(12), 1085-1099.

LASCANO, CE. 1990. Metodología para medir consumo bajo pastoreo. Nutrición de rumiantes. Guía metodológica de investigación. Editado por RUIZ, ME y RUIZ, A. San José, Costa Rica. p. 149-175.

LYNN, CA. 2014. Comparison of three digestibility markers in beef cattle fed finishing rations containing diferent sources of supplemental fat. Undergraduate Research Scholars Thesis. Texas A&M University.

LUGINBUHL, JM., POND, KR., & BURNS, JC. 1994. Whole-tract digesta kinetics and comparison of techniques for the estimation of fecal output in steers fed coastal bermudagrass hay at four levels of intake. *Journal of animal science*, 72(1), 201-211.

MAYES, RW y DOVE, H. 2000. Hugh. Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores. *Nutrition Research Reviews*, vol. 13, no 1, p. 107-138.

MACOON, B; SOLLENBERGER, LE; MOORE, JE; STAPLES, CR; FIKE, JH y PORTIER, KM. 2003. Comparison of three techniques for estimating the forage intake of lactating dairy cows on pasture¹. *Journal of Animal Science*, 81(9), 2357-2366.

MAYNARD, LA; LOOSLI, JK; HINTZ, HF y WARNER, RG. 1992. *Nutrición Animal*. 7a. ed. McGraw-Hill. México.

MAYES, RW; DOVE, H; CHEN, XB y GUADA, JA. 1995. Advances in the use of faecal and urinary markers for measuring diet composition, herbage intake and nutrient utilisation in herbivores. In *Recent Developments in the Nutrition of Herbivores*, pp. 381–406 [Journet, M, Grenet, E, Farce, M-H and Demarquilly, C, editors]. Paris: INRA Editions.

MINSON, JD. 1990. *Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press. San Diego, CA. 483 p.

MORGAN, NK., SCHOLEY, DV & BURTON, EJ. 2014. A comparison of two methods for determining titanium dioxide marker content in broiler digestibility studies. *animal*, 8(4), 529-533.

MYERS, WD; LUDDEN, PA; NAYIGIHUGU, V y HESS, BW. 2004. A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide ¹. *Journal of Animal Science*, 82(1), 179-183.

MYERS, WD; LUDDEN, PA; NAYIGIHUGU, V y HESS, BW. 2006. Excretion patterns of titanium dioxide and chromic oxide in duodenal digesta and feces of ewes. *Small Ruminant Research*, 63(1), 135-141.

OHMORI H, NONAKA I, OHTANI F, TAJIMA K, KAWASHIMA T, KAJI Y y TERADA F. 2013. An improved dry ash procedure for the detection of titanium dioxide in cattle feces. *Animal Science Journal*, 84(11), 726-731.

OWENS, FN y HANSON, CF. 1992. External and Internal Markers for Appraising Site and Extent of Digestion in Ruminants¹. *Journal of Dairy Science*, 75(9), 2605-2617.

PEDDIE, J; DEWAR, WA; GILBERT, AB y WADDINGTON, D. 1982. The use of titanium dioxide for determining apparent digestibility in mature domestic fowls (*Gallus domesticus*). *The Journal of Agricultural Science*, 99(1), 233-236.

PINA, DS., VALADARES FILHO, SC., TEDESCHI, LO., BARBOSA, AM., & VALADARES, RFD. 2009. Influence of different levels of concentrate and ruminally undegraded protein on digestive variables in beef heifers. *Journal of Animal Science*, 87(3), 1058-1067.

PONZONI, R. 1996. Manual de prácticas de manejo de alpacas y llamas. *Estudio Produccion y Sanidad Animal*, 130.

PRIGGE, EC; VARGA, GA; VICINI, JL y REID, RL. 1981. Comparison of Ytterbium Chloride and Chromium Sesquioxide as Fecal Indicators 1, 2, 3. *Journal of Animal Science*, 53(6), 1629-1633.

RUIZ, ME., & RUIZ, A. 1990. Nutrición de rumiantes. IICA Biblioteca Venezuela. (Eds.).

SAMPAIO, CB., DETMANN, E., VALENTE, TNP., SOUZA, MAD., VALADARES FILHO, SDC., & PAULINO, MF. 2011. Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), 174-182.

SAN MARTÍN, HF. 1987. Comparative forage selectivity and nutrition of South American Camelids and sheep. Doctoral thesis. Lubbock, TX. Texas Tech University.

SCHAAFSTRA, FJWC., VAN DOOR, DA., SCHONEWILLE, JT., VAN RIET, MMJ., VISSER, P., & HENDRIKS, WH. 2012. Evaluation of ADL, AIA and TiO₂ as markers to determine apparent digestibility in ponies fed increasing proportions of concentrate. In Forages and grazing in horse nutrition. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. pp. 121-123

SWAIN, DL., HANDCOCK, RN., BISHOP-HURLEY, GJ., & MENZIES, D. 2013. Opportunities for improving livestock production with e-Management systems. In Revitalising Grasslands to Sustain our Communities: Proceedings, 22nd International Grassland Congress, 15-19 September, 2013, Sydney, Australia (pp. 603-609). New South Wales Department of Primary Industry.

SPONHEIMER, M; ROBINSON, T; ROEDER, B; HAMMER, J; AYLIFE, L; PASSEY, B and EHLERINGER, J. 2003. Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits, and horses. *Small Ruminant Research*, 48(2), 149-154.

SHORT, FJ; GORTON, P; WISEMAN, J y BOORMAN, KN. 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal feed science and technology*, 59(4), 215-221.

SÜDEKUM, KH; ZIGGERS, W; ROOS, N; SICK, H; TAMMINGA, S y STANGASSINGER, M. 1995. Estimating the passage of digesta in steers and wethers using the ratio of 13C to 12C and titanium (IV)-oxide. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 31(2), 219-227.

TITGEMEYER, EC. 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of Animal Science*, 75(8), 2235-2247.

TITGEMEYER, EC; ARMENDARIZ, CK; BINDEL, DJ; GREENWOOD, RH y LÖEST, CA. 2001. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*, 79(4), 1059-1063.

VAN SAUN, RJ. 2003. Feeding the alpaca. *The Complete Alpaca Book*, second ed. Bonny Doon Press, Santa Cruz, CA, 179-232.

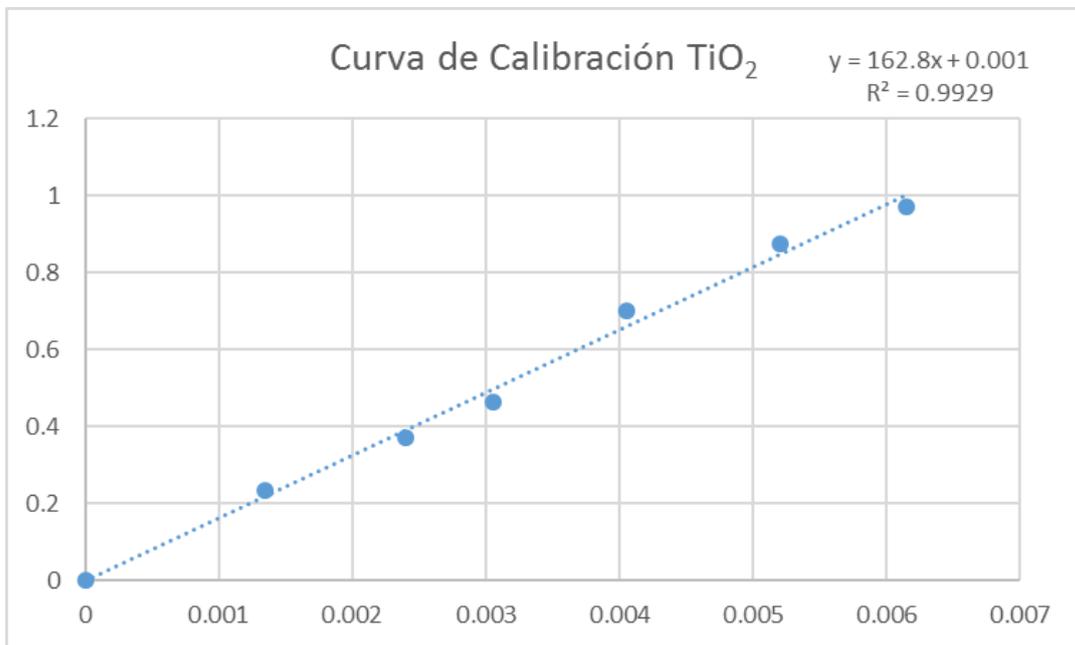
VAN SAUN, R.J. 2006. Nutrient requirements of South American camelids: A factorial approach. *Small Ruminant Research*, 61(2-3), 165-186.

VELÁSQUEZ, AV; DA SILVA, GG; SOUSA, O; OLIVEIRA, CA; MARTINS, CMMR; DOS SANTOS, PPM; BALIEIRO, JCC; RENNÓ, FP Y FUKUSHIMA,RS. 2018. Evaluating internal and external markers versus fecal sampling procedure interactions when estimating intake in dairy cows consuming a corn silage-based diet. *Journal of Dairy Science*. 101 (7), 1-12.

WANG, T & ADEOLA, O. 2018. Digestibility index marker type, but not inclusion level affects apparent digestibility of energy and nitrogen and marker recovery in growing pigs regardless of added oat bran. *Journal of animal science*, 96(7), 2817-2825.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración para espectrofotometría de dióxido de titanio



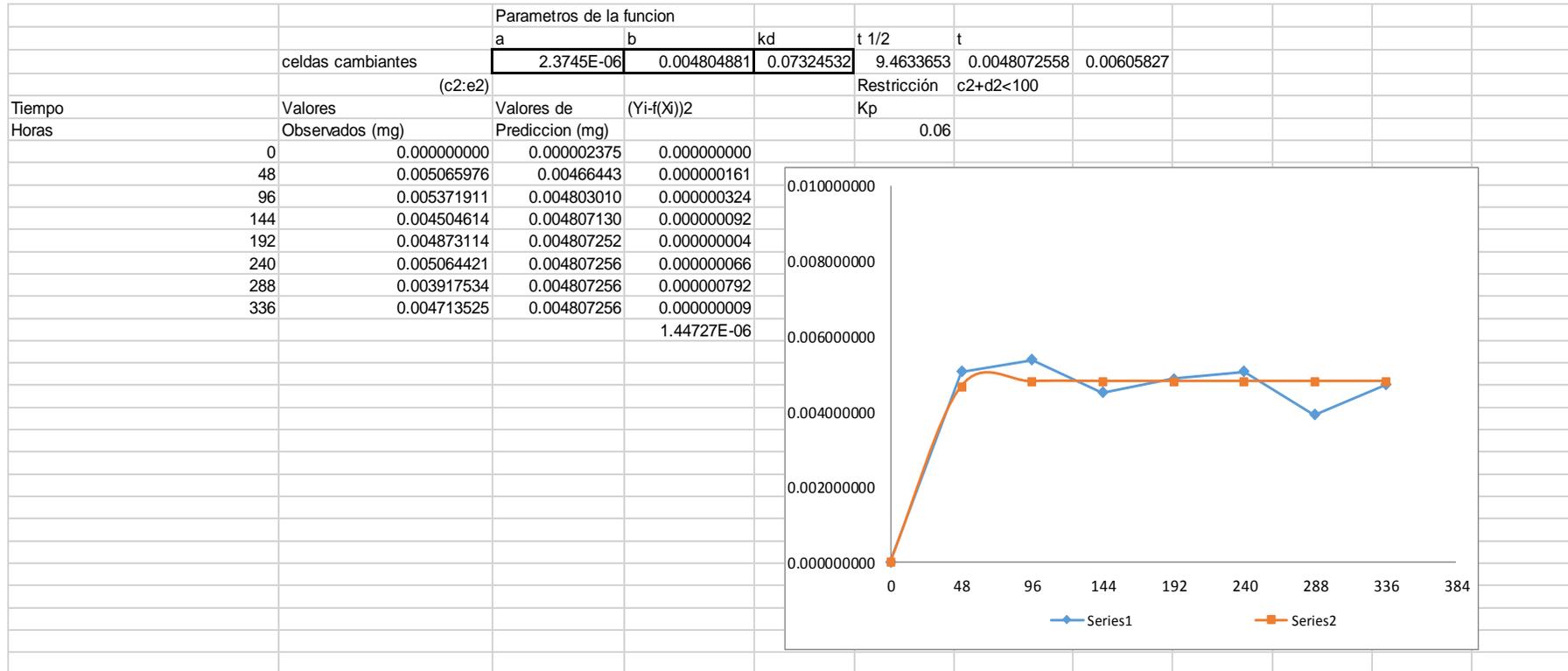
Anexo 2. Peso de heces estimado con el dióxido de titanio y peso de heces observado con las bolsas colectoras

TRATAMIENTO	PH ESTIMADO	PH OBSERVADO
1	547.9087944	420.4733161
1	491.7639592	363.0327434
1	494.0932581	487.9489298
1	494.1546007	407.3162393
1	531.3515138	517.3050401
1	686.0668934	569.8769446
1	486.500601	520.6403888
2	573.1033615	468.5199758
2	508.4920237	416.0265428
2	481.8994182	416.5630491
2	582.7105954	477.6227791
2	632.7326835	459.3534946
2	532.4536351	468.6229341
2	495.5953308	412.4222414
3	571.3943579	472.9315677
3	552.3910397	395.5580097
3	482.2637636	605.0714827
3	545.372193	395.7299227
3	428.8857675	308.1509007
3	457.9859971	336.058353
3	722.2858642	379.4250966
4	726.7903957	322.4885641
4	556.4370382	303.2172238
4	484.3573676	226.0905905
4	803.0391779	385.4961484
4	702.6461526	375.6427291
4	739.5231189	461.4679296
4	746.3353717	339.8441633

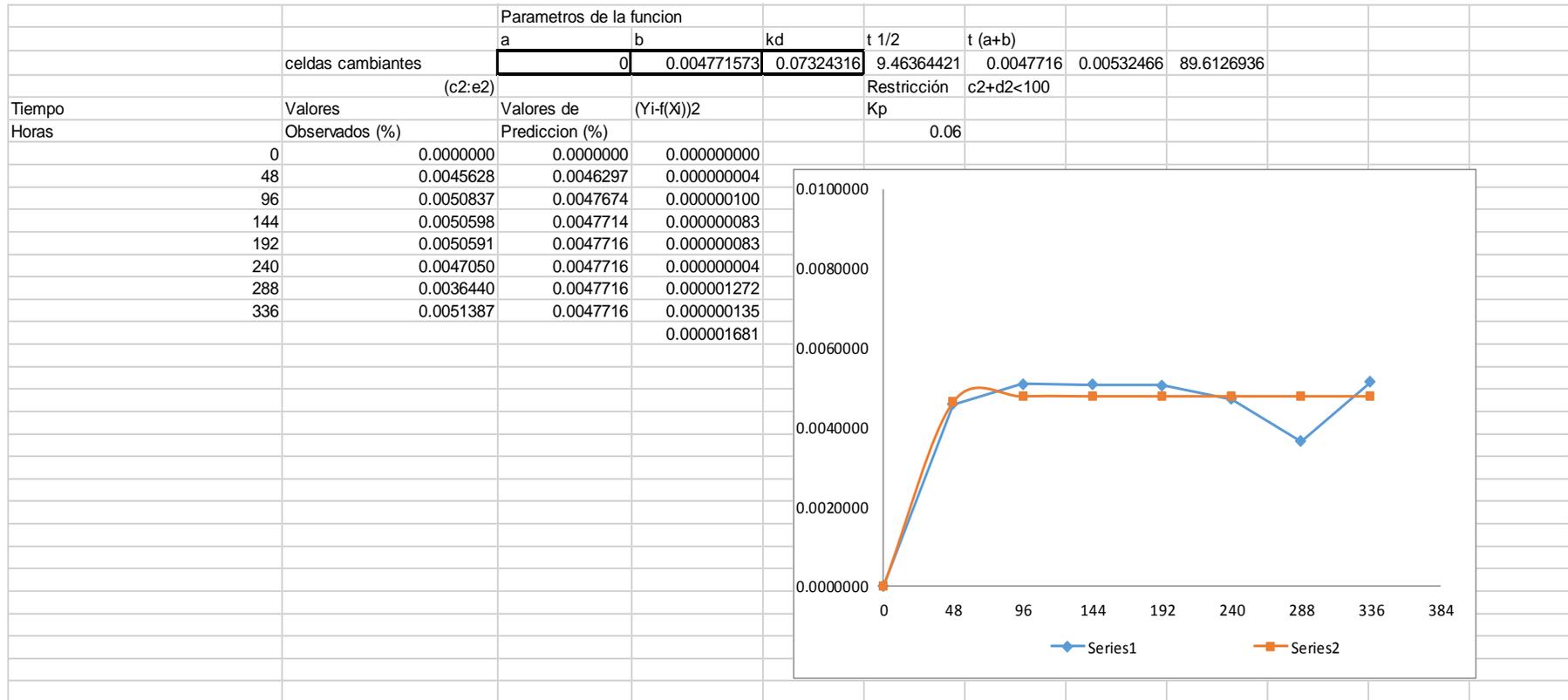
Anexo 3. Porcentajes de recuperación del dióxido de titanio

PERÍODO	TRATAMIENTO	ANIMAL	% DE RECUPERACIÓN
1	1	1	89.61269361
2	1	2	81.00185854
3	1	3	91.39864259
4	1	4	59.68944145
2	2	1	95.81682267
3	2	2	82.98368939
4	2	3	90.36415876
1	2	4	55.33708316
3	3	1	96.94879704
4	3	2	91.36148024
1	3	3	78.79329707
2	3	4	65.14745647
4	4	1	100
1	4	2	79.89041241
2	4	3	91.23775689
3	4	4	52.24780787

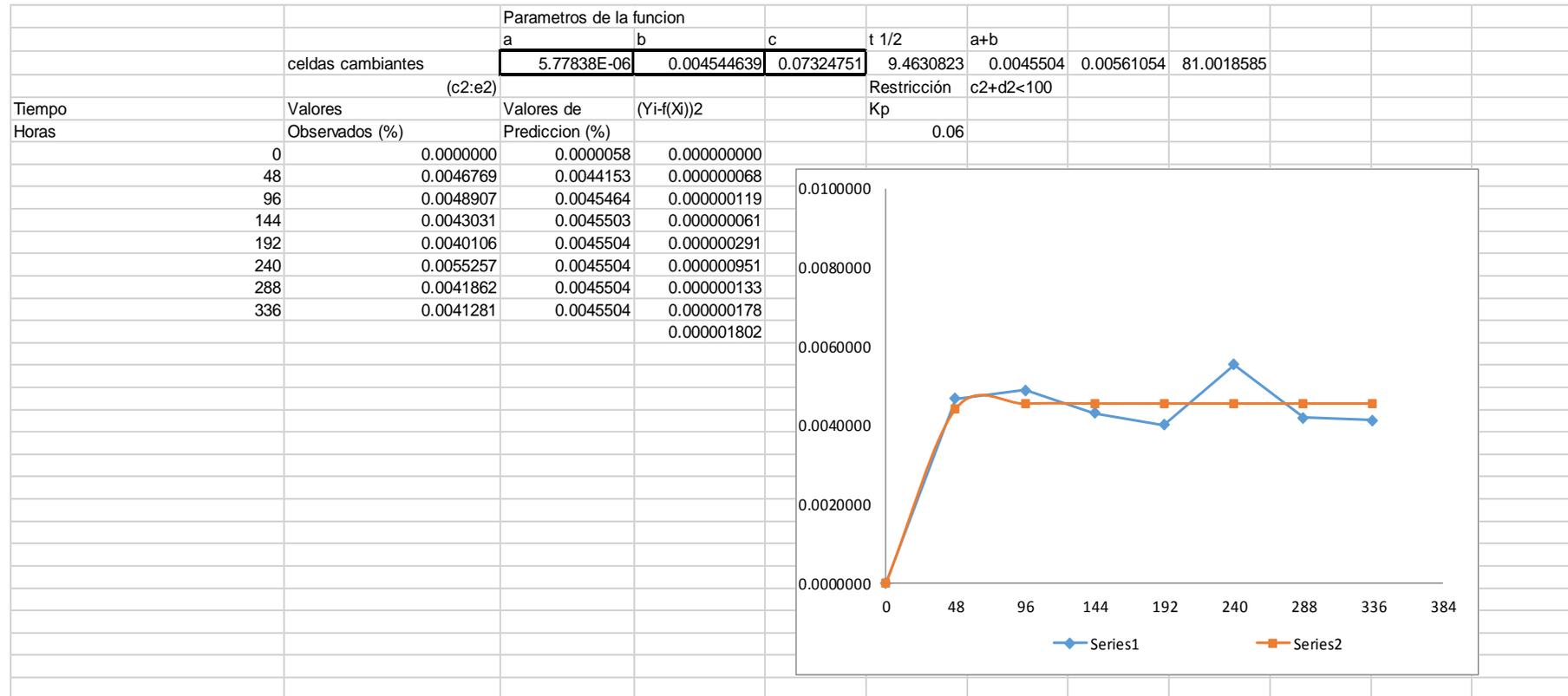
Anexo 4. Parámetros de excreción de TiO₂ del promedio del tratamiento 1



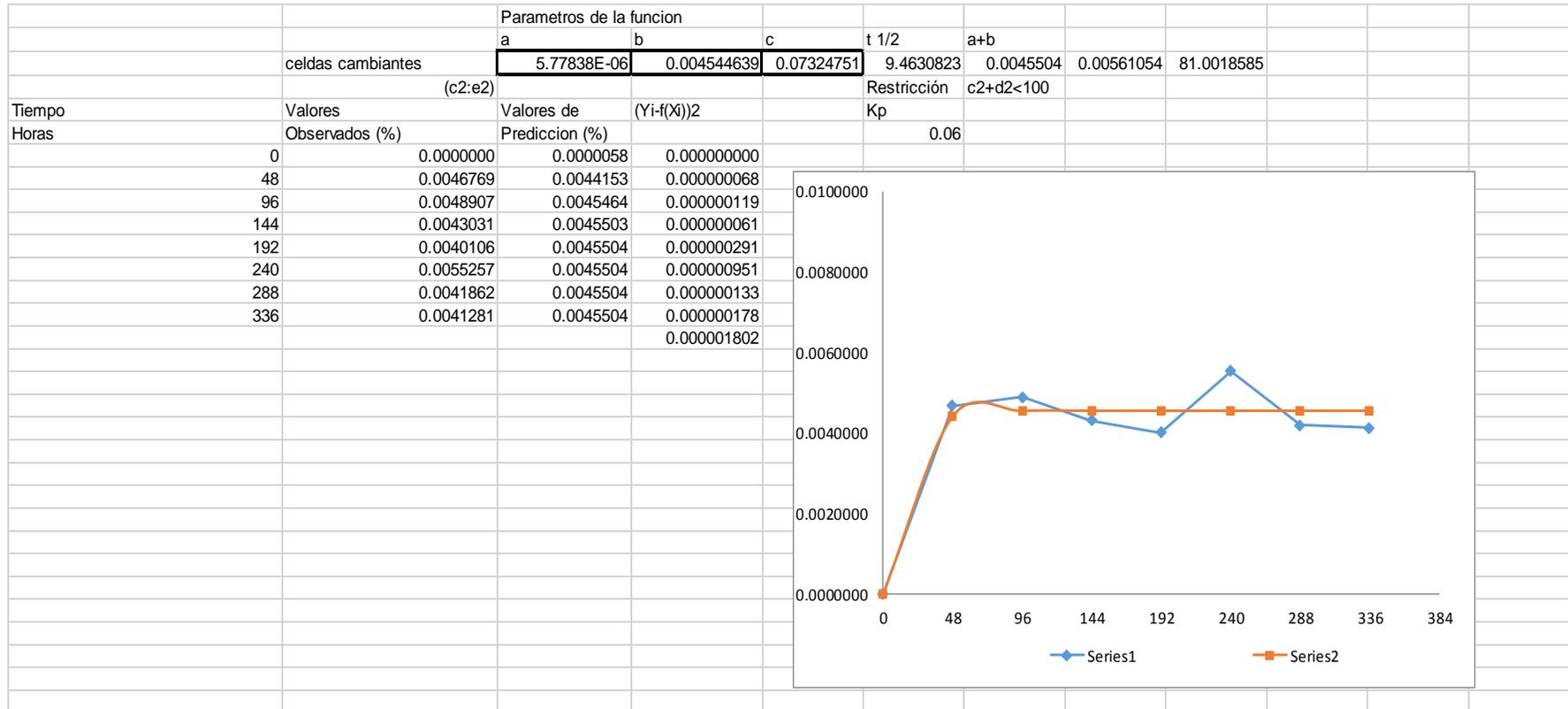
Anexo 5. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 1, tratamiento 1 y periodo 1



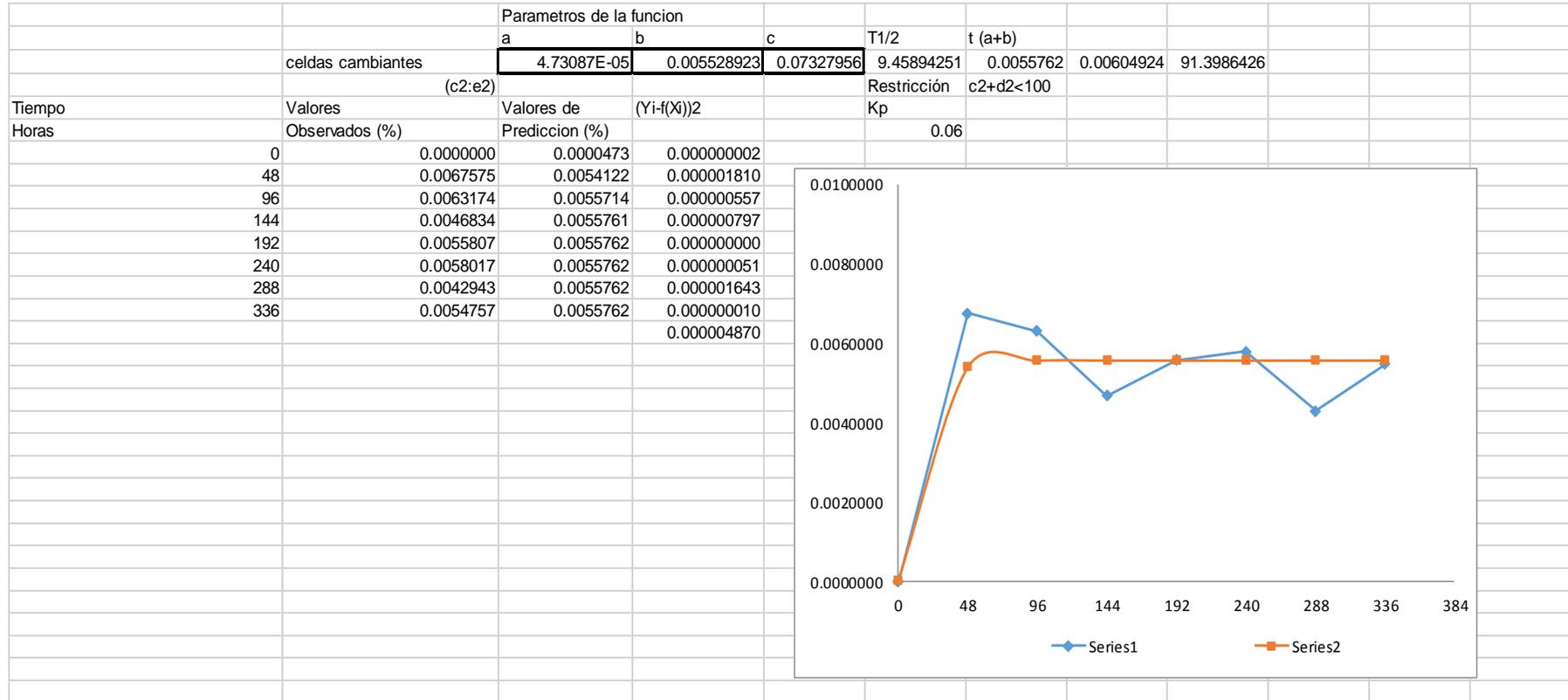
Anexo 6. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 2, tratamiento 1 y periodo 2



Anexo 7. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 2, tratamiento 1 y periodo 2

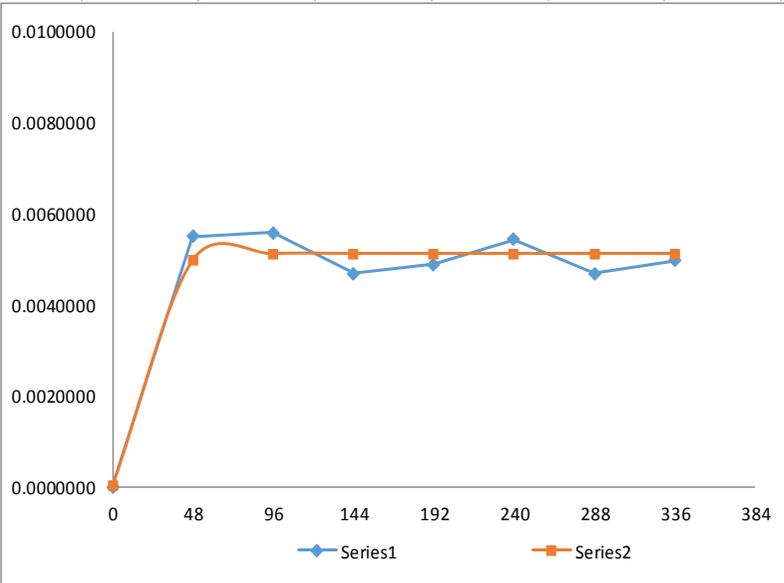


Anexo 8. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 4, tratamiento 1 y periodo 4



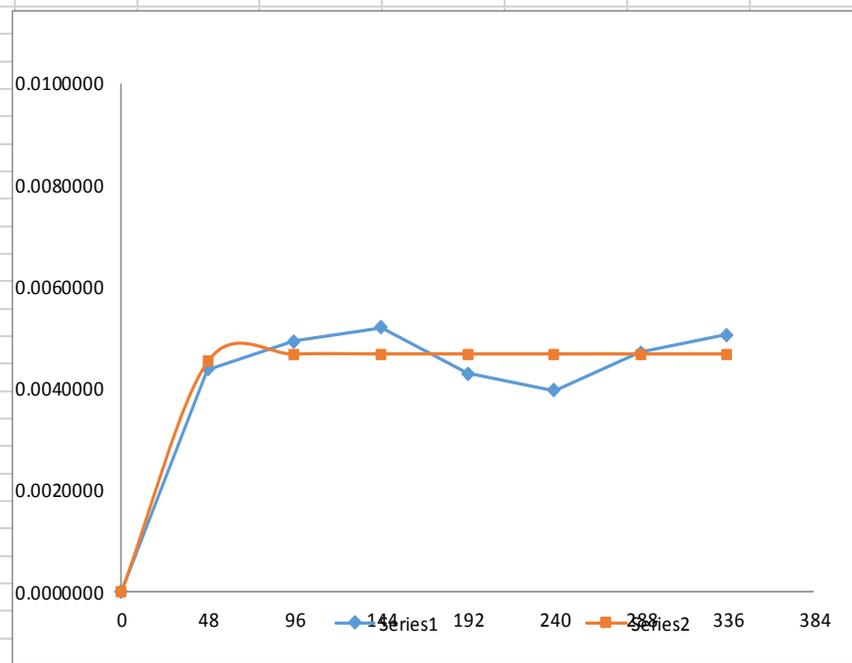
Anexo 9. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 1, tratamiento 2 y periodo 2

		Parametros de la funcion							
		a	b	c	T 1/2	t(a+b)			
celdas cambiantes		1.81156E-05	0.005101922	0.07325799	9.46172816	0.0051200	0.00532466	95.8168227	
(c2:e2)					Restricción	c2+d2<100			
Tiempo	Valores	Valores de	(Yi-f(Xi))2		Kp				
Horas	Observados (%)	Prediccion (%)			0.06				
0	0.0000000	0.0000181	0.000000000						
48	0.0054913	0.0049685	0.000000273						
96	0.0055806	0.0051155	0.000000216						
144	0.0046805	0.0051199	0.000000193						
192	0.0048731	0.0051200	0.000000061						
240	0.0054286	0.0051200	0.000000095						
288	0.0046811	0.0051200	0.000000193						
336	0.0049670	0.0051200	0.000000023						
			0.000001055						

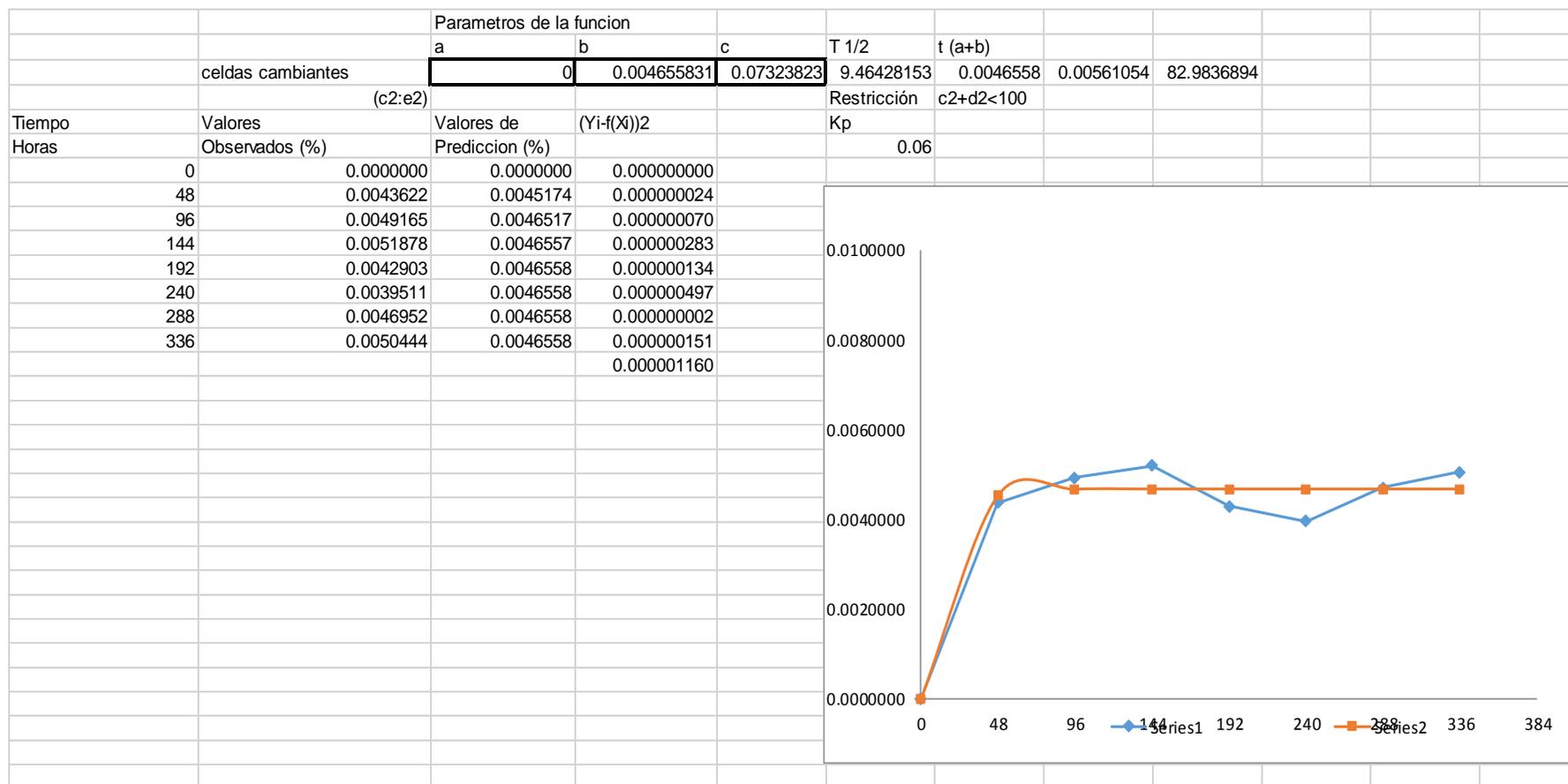


Anexo 10. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 2, tratamiento 2 y periodo 3

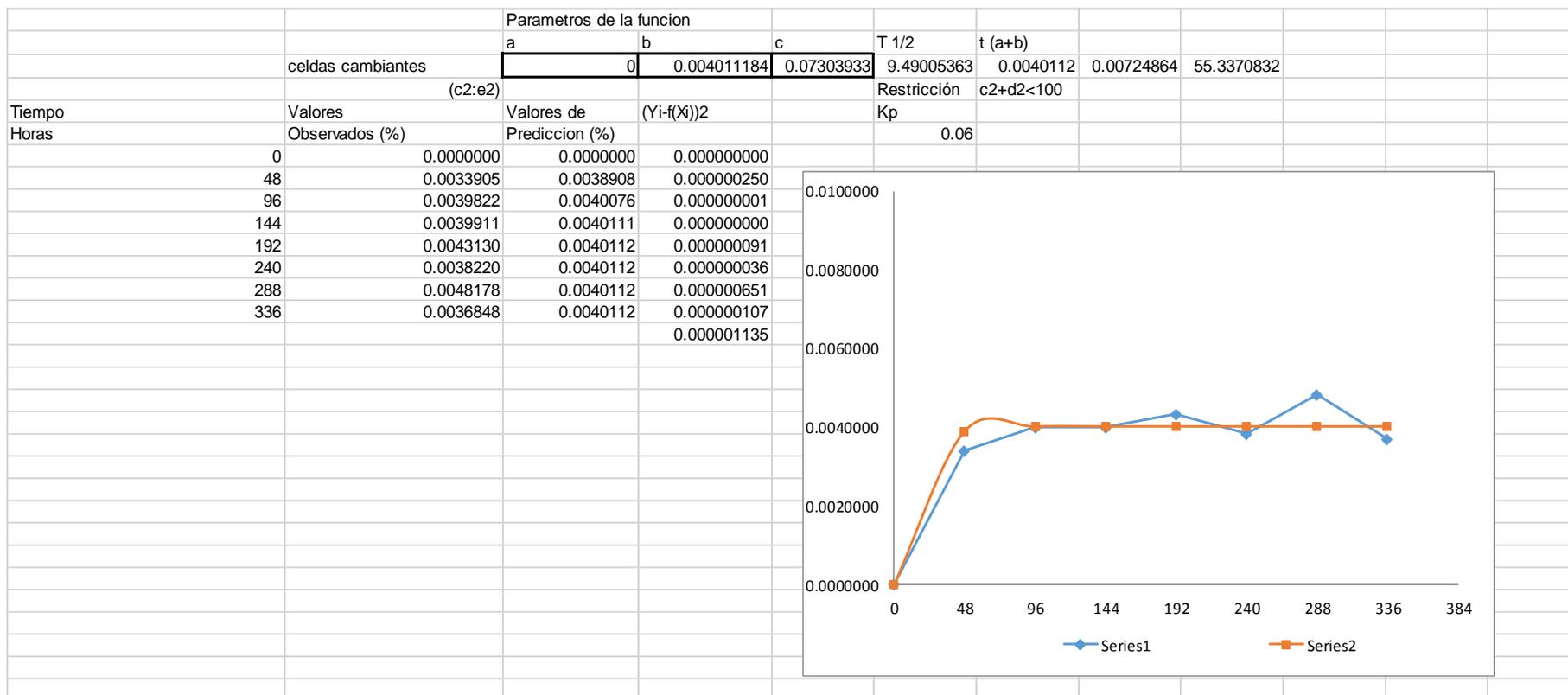
		Parametros de la funcion							
		a	b	c	T 1/2	t (a+b)			
celdas cambiantes		0	0.004655831	0.07323823	9.46428153	0.0046558	0.00561054	82.9836894	
(c2:e2)					Restricción	c2+d2<100			
Tiempo Horas	Valores Observados (%)	Valores de Prediccion (%)	(Yi-f(Xi))2		Kp				
					0.06				
0	0.0000000	0.0000000	0.000000000						
48	0.0043622	0.0045174	0.000000024						
96	0.0049165	0.0046517	0.000000070						
144	0.0051878	0.0046557	0.000000283						
192	0.0042903	0.0046558	0.000000134						
240	0.0039511	0.0046558	0.000000497						
288	0.0046952	0.0046558	0.000000002						
336	0.0050444	0.0046558	0.000000151						
			0.000001160						



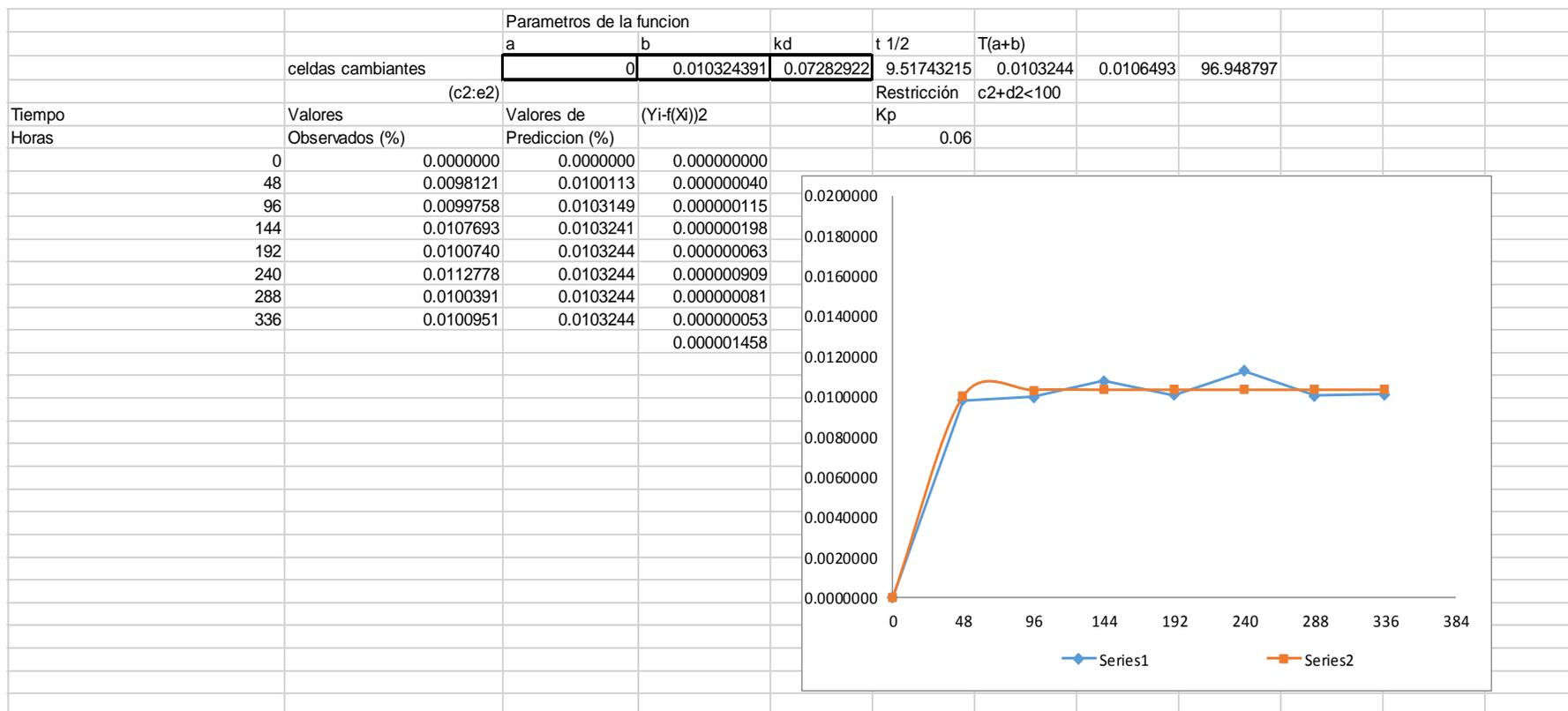
Anexo 11. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 3, tratamiento 2 y periodo 4



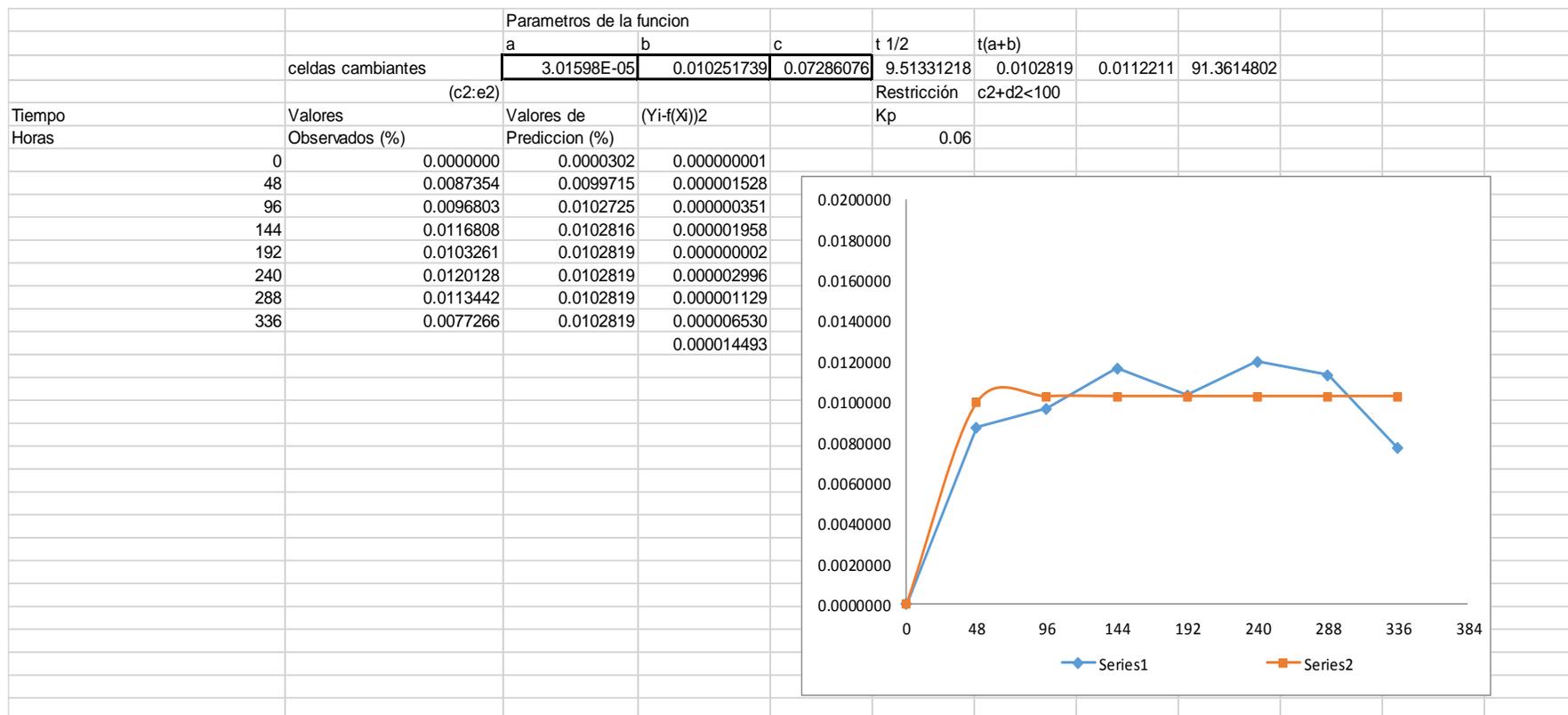
Anexo 12. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 4, tratamiento 2 y periodo 1



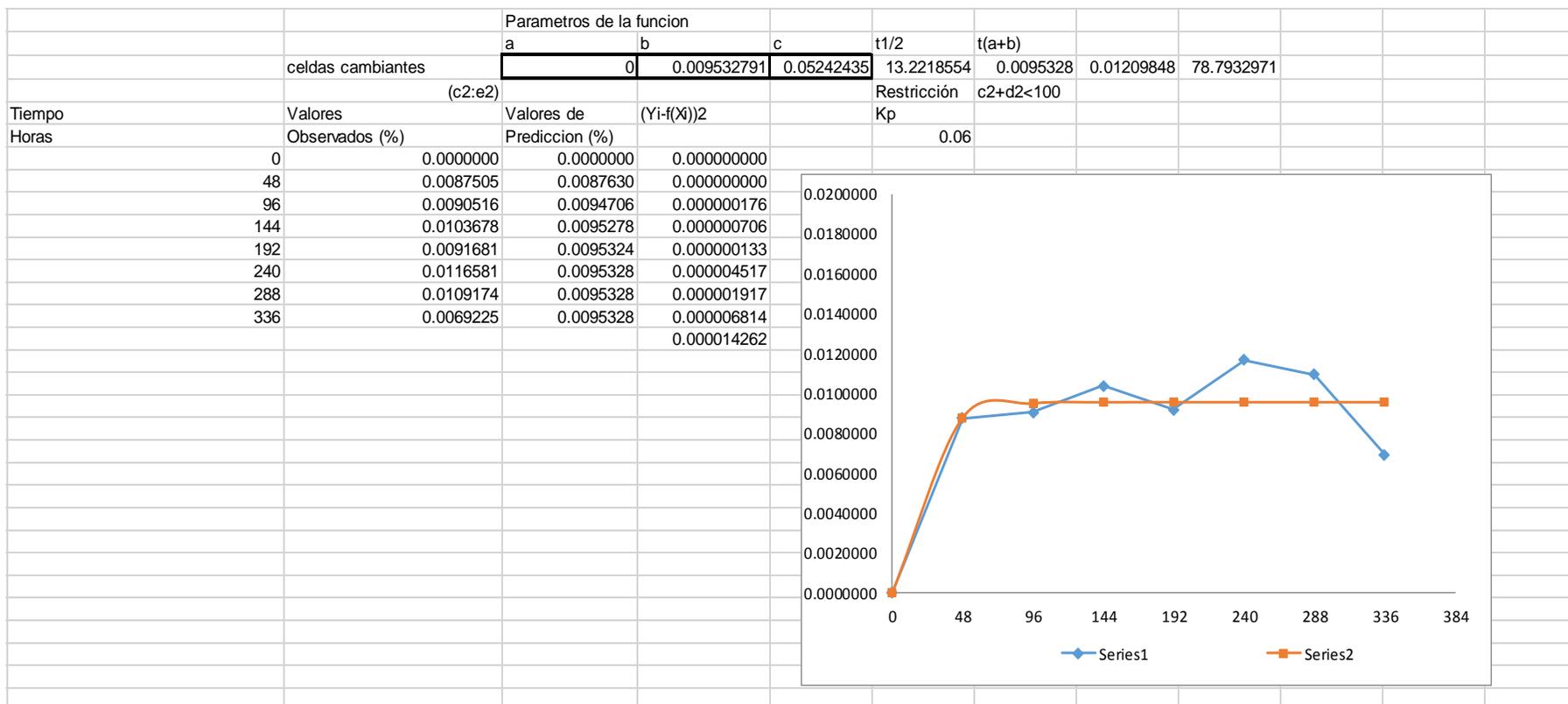
Anexo 13. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 1, tratamiento 3 y periodo 3



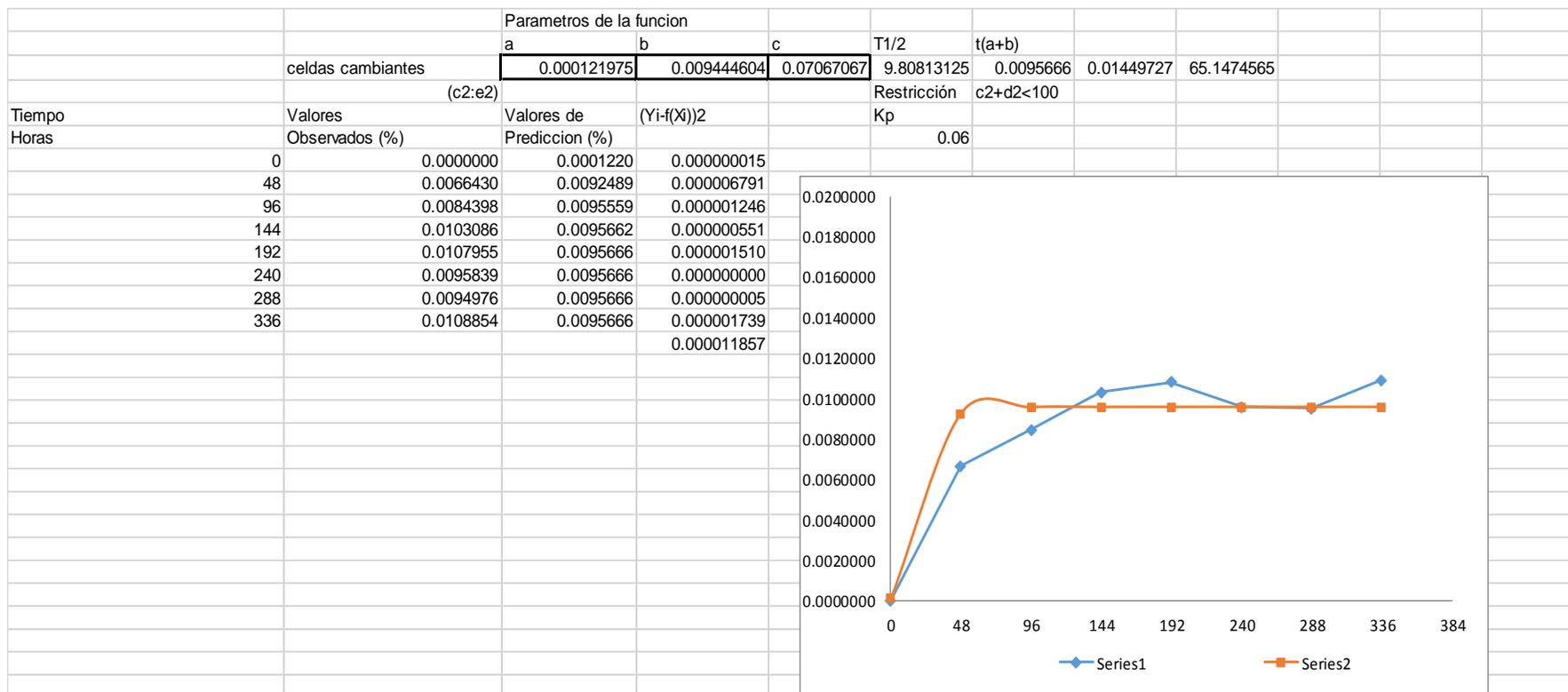
Anexo 14. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 2, tratamiento 3 y periodo 4



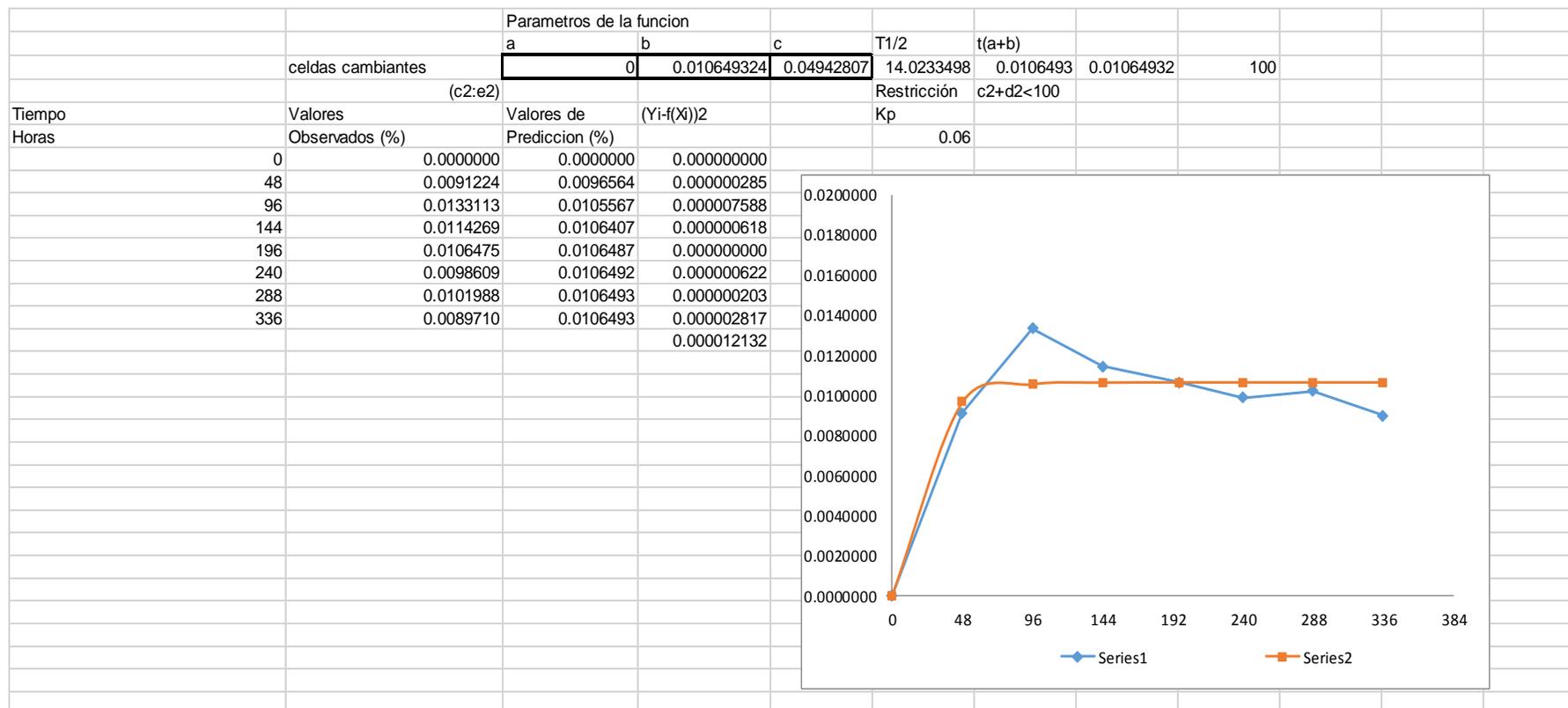
Anexo 15. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 3, tratamiento 3 y periodo 1



Anexo 16. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 4, tratamiento 3 y periodo 2



Anexo 17. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 1, tratamiento 4 y periodo 4

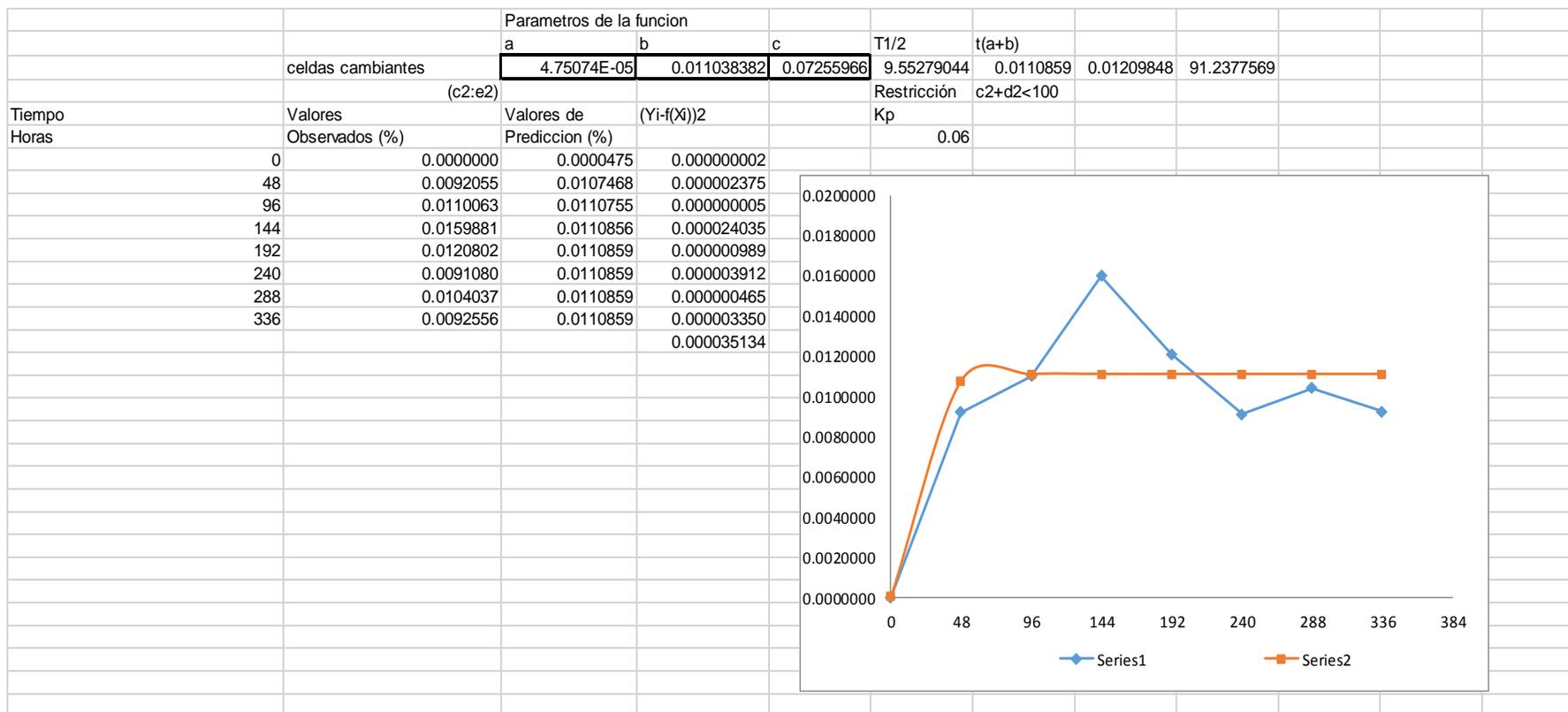


Anexo 18. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 2, tratamiento 4 y periodo 1

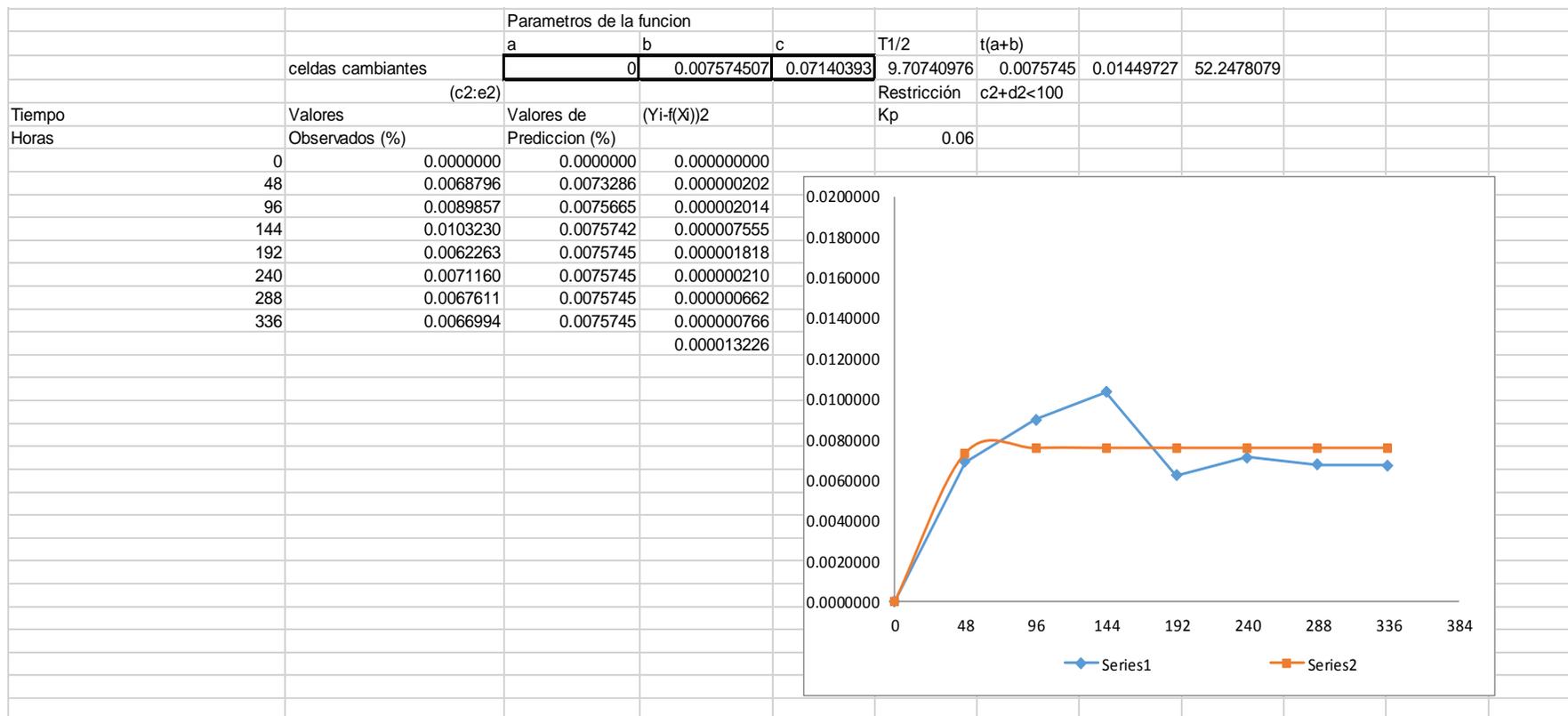
		Parametros de la funcion							
		a	b	c	T1/2	t(a+b)			
celdas cambiantes		0	0.008964562	0.07323866	9.4642248	0.0089646	0.01122107	79.8904124	
(c2:e2)					Restricción	c2+d2<100			
Tiempo	Valores	Valores de			Kp				
Horas	Observados (%)	Prediccion (%)	(Yi-f(Xi))2		0.06				
	0	0.0000000	0.00000000	0.000000000					
	48	0.0092241	0.0086980	0.000000277					
	96	0.0100168	0.0089566	0.000001124					
	144	0.0075574	0.0089643	0.000001979					
	192	0.0095477	0.0089646	0.000000340					
	240	0.0092378	0.0089646	0.000000075					
	288	0.0083803	0.0089646	0.000000341					
	336	0.0085371	0.0089646	0.000000183					
				0.000004319					

Time (Hours)	Observed (%) (Series 1)	Predicted (%) (Series 2)
0	0.0000000	0.0000000
48	0.0092241	0.0086980
96	0.0100168	0.0089566
144	0.0075574	0.0089643
192	0.0095477	0.0089646
240	0.0092378	0.0089646
288	0.0083803	0.0089646
336	0.0085371	0.0089646

Anexo 19. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 3, tratamiento 4 y periodo 2



Anexo 20. Parámetros de excreción de TiO₂ del animal 2, tratamiento 1 y periodo 2



Anexo 21. Valores de los parámetros del patrón de excreción de dióxido de titanio

PERÍODO	TRATAMIENTO	ANIMAL	a	b	c	T 1/2	T(a+b)
1	1	1	0	0.0047716	0.0732432	9.4636442	0.0047716
2	1	2	5.78E-06	0.0045446	0.0732475	9.4630823	0.0045504
3	1	3	4.73E-05	0.0055289	0.0732796	9.4589425	0.0055762
4	1	4	0	0.0043267	0.0732281	9.4655918	0.0043267
2	2	1	1.81E-05	0.0051019	0.073258	9.4617282	0.00512
3	2	2	0	0.0046558	0.0732382	9.4642815	0.0046558
4	2	3	0	0.0054663	0.068203	10.163001	0.0054663
1	2	4	0	0.0040112	0.0730393	9.4900536	0.0040112
3	3	1	0	0.0103244	0.0728292	9.5174322	0.0103244
4	3	2	3.02E-05	0.0102517	0.0728608	9.5133122	0.0102819
1	3	3	0	0.0095328	0.0524244	13.221855	0.0095328
2	3	4	0.000122	0.0094446	0.0706707	9.8081312	0.0095666
4	4	1	0	0.0106493	0.0494281	14.02335	0.0106493
1	4	2	0	0.0089646	0.0732387	9.4642248	0.0089646
2	4	3	4.75E-05	0.0110384	0.0725597	9.5527904	0.0110859
3	4	4	0	0.0075745	0.0714039	9.7074098	0.0075745