



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“EVALUACIÓN DE COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDAD  
APARENTE EN JUVENILES DE *Totoaba macdonaldi*  
MEDIANTE EL USO DE TRES MARCADORES”**



**TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER LA  
LICENCIATURA EN  
BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA**

**Presenta:**

**Diego Torres Castro**

**Ensenada, Baja California, julio 2012.**

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de los marcadores óxido de cromo, óxido de silicio y dióxido de titanio en la determinación de coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) del alimento y nutrientes. También se evaluó el efecto del tiempo sobre su estimación mediante la colecta de heces a 1 y 18 horas postprandial, en juveniles de *Totoaba macdonaldi*. El ensayo se efectuó utilizando una formulación de referencia de acuerdo a los requerimientos de la especie utilizando ingredientes altamente digestibles. A cada dieta se le adicionó el 1% de cada una de los marcadores. Las dietas se suministraron a los peces por triplicado en raciones del 2% de la biomasa por unidad durante 19 días, con 2 colectas diarias de heces. Se utilizó una columna de sedimentación que separa las heces del efluente del agua (sistema Guelph), en un sistema de recirculación de agua de mar (20.7°C, 8.4 L s<sup>-1</sup>, 34 %) y aireación continua. La unidad experimental consistió en estanques de 500 L con tres repeticiones y una biomasa inicial por tanque de 1996 ± 4 g. La dieta con dióxido de titanio presentó los menores valores de CDA más bajos para sólidos totales, proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas y energía bruta, en tanto que la dieta con óxido de silicio y cromo presentaron los valores más altos. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) de CDA de los nutrientes para proteínas, lípidos y cenizas de acuerdo al tiempo (entre 1 y 18 horas de la toma de la muestra). Concluyendo que las heces en contacto con el agua a través del tiempo pierden nutrientes utilizando cualquiera de los tres marcadores. En general, los resultados del estudio no mostraron diferencias significativas en los valores de CDA en la colecta de 1 hr entre el óxido de cromo y el dióxido de silicio, lo cual sugiere que dichos marcadores pueden ser utilizados en estudios de digestibilidad en *T. Macdonaldi*.

Palabras clave: Óxido de cromo, dióxido de titanio y óxido de silicio.

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, con paciencia, dando ánimo, acompañando tanto en los momentos de crisis, como de felicidad.

Un gran agradecimiento a la Universidad Autónoma de Baja California, por darme la oportunidad de realizar mis estudios dentro de esta gran institución. De manera consiguiente también agradezco a la Facultad de Ciencias Marinas la cual fue el marco para mi aprendizaje académico y personal. También deseo agradecer a la UABC por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento muy grande al Dr. Eduardo Durazo Beltrán por sus enseñanzas, su paciencia, el entusiasmo compartido, por darme la oportunidad de aprender de su experiencia y haber confiado en mi persona.

A mis sinodales la Dr. Ma. Teresa Viana Castrillón por sus observaciones tan acertadas, y al M.C. Conal D. True por su paciencia en el laboratorio y el tiempo que dedicado a este estudio.

A la Dra. Lus Lopez Acuña y a todos los tesisistas en el laboratorio de nutrición por su paciencia y enseñanzas.

A mis padres, simplemente no tengo palabras para expresar mi agradecimiento por su apoyo, amor, cariño y comprensión. A mi familia que me apoyo incondicionalmente.

A mis amigos que me acompañaron en esta aventura, por su confianza y su lealtad.

A la vida por darme esta oportunidad de cumplir mis sueños y metas.

A todos, mil gracias!

## INDICE

No.	CONTENIDO	No. Pag.
<b>I.</b>	<b>Introducción</b>	<b>6</b>
<b>II.</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>9</b>
<b>III.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>IV</b>	<b>Material y métodos</b>	
	Elaboración de las dietas experimentales	<b>14</b>
	Sistema de cultivo	<b>16</b>
	Acondicionamiento de organismos	<b>17</b>
	Colecta y conservación de muestras de heces	<b>17</b>
	Análisis de composición química proximal de alimentos formulados y heces	<b>19</b>
	Determinación de contenido de marcadores en los alimentos formulados y heces	<b>19</b>
	Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente del alimento y nutrientes	<b>22</b>
	Análisis estadístico	<b>22</b>
<b>V.</b>	<b>Resultados</b>	<b>24</b>
<b>VI.</b>	<b>Discusión</b>	<b>29</b>
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>34</b>
<b>VIII.</b>	<b>Referencias</b>	<b>35</b>

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

No.	Contenido	No. Pag.
<b>Figura 1.</b>	Dietas experimentales con diferentes marcadores digestivos (Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , SiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> ) para juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b>	Sistema de colecta	<b>18</b>
<b>Figura 3</b>	Filtrado de heces	<b>18</b>
<b>Figura 4</b>	Almacenamiento	<b>18</b>
<b>Figura 5.-</b>	Diagrama de flujo de la metodología	<b>23</b>
<b>Tabla I.</b>	Contenido de ingredientes (g/ 100 g) de dietas formuladas con marcadores (OC: óxido de cromo; OS: óxido de silicio; OT: óxido de titanio ) para ensayos de digestibilidad con juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	<b>15</b>
<b>Tabla II.</b>	Análisis químico (en base seca) de dietas experimentales con marcadores (OC: óxido de cromo; OS: óxido de silicio; OT: óxido de titanio) para ensayos de digestibilidad con juveniles de totoaba.	<b>24</b>
<b>Tabla III</b>	Contenidos de proteína cruda, lípidos totales y cenizas (g/100 g, base seca) en heces del ensayo de alimentación con juveniles de totoaba con dietas experimentales conteniendo marcadores.	<b>25</b>
<b>Tabla IV</b>	Coefficientes de digestibilidad aparente de sólidos totales, proteína cruda, lípidos totales y cenizas de dietas experimentales conteniendo marcadores en ensayo de alimentación con juveniles de totoaba con dos colectas de heces a través del tiempo.	<b>27</b>
<b>Tabla V.</b>	Evaluación de la biomasa inicial y final.	<b>27</b>
<b>Tabla VI.-</b>	Análisis de varianza de dos vias entre tiempo y marcador,	<b>28</b>

## INTRODUCCION

La acuicultura es uno de los sectores de producción de alimentos de origen animal con un crecimiento dinámico, el cual complementa a la pesca ya que se ha mantenido en niveles de producción casi constantes desde 1987 debido a factores como la sobreexplotación de los recursos pesqueros. Esta situación a promovido que la acuicultura se ubique como una alternativa adecuada para sustentar la demanda de proteína de la población mundial creciente (FAO, 2010).

El alimento y los costos de alimentación, son en general la fracción más onerosa dentro de las empresas dedicadas al cultivo de organismos acuáticos a nivel semiintensivo o intensivo, por lo cual la nutrición se ha convertido en una de las áreas de investigación y desarrollo más importante dentro de la acuicultura (Tacon, 1989).

La caracterización nutricional de materias primas e ingredientes son referentes básicos del proceso de evaluación de los alimentos formulados. La composición química, variabilidad en composición, el tipo de fuentes y contenido de nutrientes son factores de importancia que se requiere documentar. Así mismo, es importante conocer la digestibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes presentes en los ingredientes y alimentos (Allan *et al.*, 2000; Glencross *et al.*, 2007; Saavedra *et al.*, 2007).

La digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias que pueden ser absorbidas para posteriormente ser asimiladas por el organismo. Esta comprende dos fases, la digestión que corresponde a la hidrólisis de las macromoléculas de los alimentos, y la absorción en el intestino de las moléculas derivadas de la actividad hidrolítica. La biodisponibilidad se relaciona con la proporción del nutriente que es absorbido a través del intestino para ser utilizado en el metabolismo para mantenimiento y producción de masa corporal (Littell *et al.*, 1997; Glencross *et al.*, 2007). La

digestibilidad constituye una excelente medida de calidad nutricional de un alimento y ello ha promovido el desarrollo de metodologías para evaluarla: Métodos *in vitro*, en los cuales el alimento y sus nutrientes se someten a la acción de enzimas digestivas en condiciones que asemejan el proceso digestivo. Los métodos *in vivo*, consisten en alimentar a los organismos de estudio y después coleccionar las heces que se generan. Esto podría realizarse a través de la colección total cuantitativa de las heces emitidas, o bien, con una colecta parcial pero utilizando un marcador inerte indigerible el cual al estar incorporado en el alimento, es factible el cuantificarlo tanto en el alimento como en las heces y a partir de la diferencia en concentración se estima la digestibilidad (Chong *et al.*, 2002; Tonheim *et al.*, 2007; Sales, 2008). Para seleccionar el tipo de marcador es necesario considerar las características del compuesto, entre las cuales están las siguientes: Sustancia inerte y no tóxica, no ser absorbida ni metabolizada en su paso por el tracto digestivo y debe ser recuperada completamente tanto de materias primas como de alimentos procesados, no tener efectos fisiológicos ni influir en el proceso de digestión, debe mezclarse íntimamente con el alimento y mantenerse uniformemente distribuida en el contenido digestivo, paso por el tracto digestivo de forma similar al alimento, no tener efecto sobre la microflora del tracto digestivo de importancia en el hospedero, facilidad para su determinación analítica reproducible y no influir en la palatabilidad del alimento. La evaluación de dichas características permite estimar la eficacia del marcador en las condiciones en las cuales se desarrolla el estudio de digestibilidad (Jagger *et al.*, 1992; Marais, 2000)

La información sobre coeficientes de digestibilidad de los ingredientes es muy útil no sólo para permitir la formulación de las dietas que maximizan el crecimiento de los peces al proporcionar cantidades adecuadas de nutrientes disponibles, sino también para reducir los productos de excreción de los organismos cultivados (Lee, 2002).

En el estudio de la digestibilidad *in vivo* con el uso de un marcador se cuantifica la proporción digestible de la materia seca de la dieta y/o de los nutrientes mediante el contenido de un marcador indigerible en el alimento y en la materia fecal, a partir de la relación entre esos contenidos se determina la digestibilidad aparente del alimento y los nutrientes. Sin embargo, si bien este procedimiento permite calcular el grueso de lo que es aprovechado, no considera los productos metabólicos que son producto de la utilización interna de tejidos de reserva o apoptosis (muerte celular), materia orgánica que se refleja contenida en las heces. Por esta razón es que este procedimiento no puede determinar la digestibilidad verdadera solo la aparente (Kitagima y Fracalossi, 2010). De igual forma, factores como el lavado de nutrientes del alimento (lixiviación), más la pérdida por lavado de las heces pueden influir en la calidad de los resultados.

Cabe resaltar la importancia de contar con un alimento digestible, no solo por cubrir eficientemente los nutrientes requeridos, sino también por el contar con un mínimo de desechos orgánicos al medio ambiente y así minimizar el impacto de materia orgánica como nitrógeno, fósforo y materia seca, los cuales en distintos estudios realizados en Europa señalan que entre el 10 y 25 % del alimento es descargado al ambiente y acumulado sobre los sedimentos en las cercanías de las instalaciones del cultivo (FAO, 1994)



## ANTECEDENTES

El óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) es el compuesto que más comunmente se ha utilizado como marcador en estudios de digestibilidad, su uso como marcador en estudios de digestibilidad fue propuesto en 1918 en estudios con vacas lecheras, posteriormente su aplicación se generalizó en estudios de digestibilidad en ovejas, cerdos, vacas, caballos, terneros e incluso en humanos (Schurch, *et al.*, 1950;), así como en peces (Nose, 1960, 1961). En estudios en peces el uso del óxido de cromo es muy frecuente, como se ha reportado en estudios de digestibilidad en trucha arcoíris (Morales *et al.*, 1999), en la lubina *Dicentrarchus labrax* (Spyridakis *et al.*, 1989; Gómez de Silva y Oliva Teles, 1998); en la brótola *Urophycis brasiliensis* (Bolasina, 2005) y en tilapia (Flores *et al.*, 2002; Sklan *et al.*, 2004; e.g. Fagenbro & Jauncey, 1993; Fontainhas-Fernandes *et al.*, 1999). Estudios en peces, con óxido de cromo como marcador, reportan que su paso a través del tracto digestivo ocurre a una velocidad diferente a la del alimento; así mismo, pequeñas cantidades del compuesto pueden ser absorbidas, lo cual puede causar una subestimación de la digestibilidad (Li *et al.*, 2008). En tilapia híbrida se reportada que el óxido de cromo en la dieta influye en la digestibilidad y el metabolismo de carbohidratos (Shiau y Liang, 1993). Inconvenientes en el uso de este marcador se han reportado en carpa dorada *Carassius auratus* (De Silva, Deng & Rajendram, 1997) en la dorada *Sparus aurata* (Fernandez *et al.*, 1999) y en diversas especies de crustáceos (Forster & Gabbott, 1971; Newman & Lutz, 1982; Bordner *et al.*, 1983; Leavitt, 1985)

Otro marcador de uso común en estudios de digestibilidad son las cenizas insolubles en ácido (CIA), las cuales están integradas principalmente por sílice o dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ). Este es un marcador que puede ser interno si está contenido en un nivel detectable como parte de la composición de los ingredientes del alimento, o externo si se adiciona para incrementar su concentración y así facilitar su cuantificación (Goddard y Malean, 2001). El dióxido de silicio constituye la parte de las cenizas que no son absorbidas por los organismos animales. Las CIA se han utilizado como marcador en estudios de digestibilidad en cerdos, pollos y rumiantes (Waterbee

y Gruber, 1993) y en diversas especies de organismos acuáticos, debido a la facilidad de análisis, reproducibilidad y bajo costo se le considera como una alternativa para la determinación de digestibilidad (Li *et al.*, 2008). Este marcador ha sido utilizado en estudios de digestibilidad en organismos acuáticos, tales como la trucha arcoíris (Atkinson *et al.*, 1984) el tiburón limón (Wetherbee *et al.*, 1993), el atún aleta azul (Aguado *et al.*, 2004); el abulón azul (*Haliotis fulgens*) (Montaño 2002); el tambor rojo (*Sciaenops ocellatus*) y en robalo híbrido (*Morone chrysops x M. saxatilis*) (Li. *et al.*, 2008). Sin embargo el uso de CIA como marcador puede presentar inconvenientes asociados al tipo de fuente del marcador, diferencia con relación al alimento en el paso por el tracto digestivo, efecto de la presencia de material indigerible (Li *et al.*, 2008) y como marcador externo el grado de uniformidad con el alimento a través del proceso digestivo (Waterbee y Gruber, 1993).

El uso de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) ha sido reportado como marcador externo en estudios de digestibilidad en ratas (Lloyd *et al.*, 1955; Roselund y Njaa, 1982), bovinos (Titgemeyer *et al.* 2001; Myers *et al.*, 2004), en aves (Yutse *et al.*, 1991; Short *et al.* 1995; Kluth y Rodehutschord, 2006; Van Krimpen *et al.*, 2010), cerdos (Jagger *et al.*, 1992; Yin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005); en borregos (Myers *et al.*, 2006; Glindemann *et al.*, 2009), en peces de agua dulce como tilapia *Oreochromis niloticus* (Richter *et al.*, 2003) y trucha arcoíris *Onchorincus mykiss* (Weatherup y MacCracken, 1998; Vanderberg y De la Noue, 2001). En peces marinos el uso de óxido de titanio como marcador de digestibilidad solo ha sido reportado en bacalao (Lied *et al.*, 1982). Dentro de las desventajas del uso de óxido de titanio para determinar coeficientes de digestibilidad se reportan la dificultad para una distribución homogénea en la dieta por su tendencia a agregarse en el proceso de elaboración del alimento (Weatherup y MacCracken, 1998), el efecto del marcador en el retraso del proceso digestivo de la evacuación estomacal (Richter *et al.*, 2003)

Otros marcadores digestivos externos empleados en estudios con trucha arcoíris, comprenden el uso de  $^{32}\text{P}$  en la forma de fosfomolibdato de amonio (Hirao, 1960; Yamada, 1962), partículas de polietileno (Tacon y Rodrigues, 1984). También se ha evaluado el uso de óxidos trivalentes como  $\text{La}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$  y  $\text{Yb}_2\text{O}_3$  en salmón del Atlántico (Austreng, 2002), óxido de bario (Riche *et al.* 1995) y 5- $\alpha$ -colestano (Sigurgisladdottir, 1990).

La colecta de heces es importante para poder determinar el valor real del marcador con respecto al total de heces producidas, por lo que el método de colecta resulta ser importante. Es así que se reportan diferentes tipos de colecta de las heces en peces; el sifoneado (Buddington, 1980), la o decantación en columna (Cho *et al.*, 1985, Cho & slinger 1979), a través de un filtro rotatorio mecanizado a la salida (Choubert *et al.*, 1982), extracción directa de la cámara metabólica (Smith, 1971) colecta directa del organismo, usando presión abdominal (Li *et al.*, 2008., Percival *et al.*, 2001), succión anal (Windell *et al.* 1978) o disección (Austreng, 1978). Vandenberg y de la Noue (2001) reportan un CDA mayor para proteína y materia seca con el método de obtención de heces mediante decantación en columna, con relación a los procedimientos de colecta por filtración o de presión abdominal de los cuales se tienen CDA más bajos, con excepción del CDA para lípidos donde se reportan valores más altos en la colecta por filtración que en el método de columna.

Otra fuente de variación de los CDA está asociada al tiempo de colecta de las heces, ya que se asocia a la lixiviación de los constituyentes de las muestras. La comparación entre tiempos de colecta ha sido estudiado en especies como el bagre (*Ictalurus punctatus*) consistiendo entre 1 y 12 horas (Kitajima, 2010), en la perca plateada (*Bidyanus bidyanus*) con colectas a la 3, 6, 9, 12, 15 horas postprandial (Allan *et al.*, 1999.) y en trucha arcoíris *Salmo gairdneri* con colectas entre 1 y 16 horas postprandial ( Windell *et al.*, 1978). Sin embargo, la pérdida de nutrientes a través de la lixiviación es mínima cuando las heces permanecen quietas antes de ser colectadas y son menores mientras más rápido se colecten después de ser producidas (Vanderberg y De la Noüe, 2001).

En este estudio se utilizó *Totoaba Macdonaldi* (Teleostei: Sciaenidae) (Gilbert 1890) como organismo de estudio. La totoaba es un pez endémico del Golfo de California y una de las especies más grandes de la familia Scianidae, llegando a medir hasta dos metros de longitud y a pesar más de 100 kg. La distribución original de la totoaba se estima desde la desembocadura del río Colorado hasta Bahía Concepción en la costa oeste del Golfo, y hasta la boca del río Fuerte en el este; sin embargo, actualmente se le considera restringida a la zona del Alto Golfo de California (Valenzuela-Quiñonez *et al.*, 2001) la cual se encuentra enlistada en peligro de extinción en la normatividad mexicana (Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL- 059-91). En años recientes se ha logrado reproducirla en cautiverio y se han liberado juveniles en su medio natural con fines de repoblación; así mismo se ha desarrollado la biotecnología para su cultivo en cautiverio (True, 2011). Sin embargo aun se requieren más estudios nutricionales de la especie para impulsar y optimizar su cultivo.

Aun cuando en especies de peces como la trucha arcoíris se cuenta con un conocimiento amplio sobre coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de nutrientes de alimentos y materias primas, tanto de origen animal como vegetal (Nose, 1960; Smith, 1971; Cho *et al.*, 1982; Jobling, 1983; Dimes y Haard, 1994; Bureau *et al.*, 1998; Weatherup y McCracken, 1998; Vandenberg y De La Noue, 2001; Dernekbaşı, 2012), en totoaba a la fecha no se cuenta con trabajos o estudios reportados sobre la digestibilidad de alimentos o ingredientes.

El propósito del presente trabajo fué evaluar el uso de los marcadores inorgánicos externos  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ , y  $\text{TiO}_2$  para estimar los coeficientes de digestibilidad aparente en dos tiempos de colecta de heces con juveniles de *Totoaba macdonaldi* como organismo de estudio. El estudio se enfocó a generar información sobre el uso de dichos marcadores en una especie con potencial de cultivo en la cual se requiere generar un mayor conocimiento de la digestibilidad de nutriente

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar coeficientes de digestibilidad aparente de nutrientes en juveniles de *Totoaba macdonaldi* obtenidos mediante el uso de tres marcadores externos.

### **Objetivos particulares.**

- Evaluar el uso de los marcadores externos  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y  $\text{SiO}_2$  para estimar digestibilidad de nutrientes en juveniles de *Totoaba Macdonaldi*.
- Evaluar el efecto del tiempo de colecta de las heces, a 1 hora y 18 horas en los coeficientes de digestibilidad aparente de nutrientes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo de alimentación con juveniles de *Totoaba macdonaldi* se realizó en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la UABC, con organismos proporcionados por la UBP.

Las determinaciones analíticas de composición de muestras y contenido de marcadores se desarrollaron en el Laboratorio de Nutrición de la FCM y en el Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC.

- **Elaboración de las dietas experimentales.**

Se elaboraron 3 dietas experimentales con la misma formulación (Tabla I) en donde a cada una se le adicionó un marcador diferente al 1% de la dieta (OT: óxido de titanio; OC: óxido de cromo; OS: óxido de silicio). Previo a la elaboración de las dietas los ingredientes se tamizaron a un tamaño de partícula de 230 micras. El almidón y la gelatina se hidrataron por separado antes de agregarlos a la mezcla de ingredientes. La harinas de pescado y de krill, vitaminas, minerales, celuosa y marcador se homogeneizaron en una mezcladora comercial (Kitchen Aid) y posteriormente se adicionó la mezcla de almidón y gelatina. El alimento se peletizó a un tamaño de 4 mm y se secó en estufa de convección a  $60 \pm 2^\circ$  C por 12 horas. Los pelets secos se almacenaron en bolsas de plástico herméticas a  $-20^\circ$  C hasta su uso. Las características de composición de las dietas fueron similares: proteína cruda 54%, lípidos totales 9.7%, carbohidratos 26.3%, energía bruta 21.1 kJ/g, relación PC/EB 25.7 mg/kJ (Tabla II).

**Tabla I.** Contenido de ingredientes (g/ 100 g) de dietas formuladas con marcadores (OC: óxido de cromo; OS: óxido de silicio y OT: óxido de titanio ) para ensayos de digestibilidad con juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

INGREDIENTE	DIETA		
	OC	OS	OT
Harina de pescado <sup>a</sup>	65.2	65.2	65.2
Harina de Krill <sup>b</sup>	10.0	10.0	10.0
Celulosa <sup>c</sup>	4.4	4.4	4.4
Almidón de maíz <sup>d</sup>	10.0	10.0	10.0
Gelatina <sup>e</sup>	5.0	5.0	5.0
Minerales <sup>f</sup>	2.0	2.0	2.0
Vitaminas <sup>g</sup>	3.0	3.0	3.0
Cloruro de colina <sup>h</sup>	0.5	0.5	0.5
Acido ascórbico <sup>i</sup>	0.4	0.4	0.4
Oxido de cromo <sup>j</sup>	1.0	0.0	0.0
Oxido de silicio <sup>k</sup>	0.0	1.0	0.0
Oxido de titanio <sup>l</sup>	0.0	0.0	1.0

<sup>a</sup> Harina de pescado, Skretting, Canadá.

<sup>b</sup> Harina de krill entero, Skretting, Canadá.

<sup>c</sup>  $\alpha$ -Celulosa, sigma-Aldrich, EUA.

<sup>d</sup> Iris, EUA.

<sup>e</sup> Nabisco, EUA.

<sup>f</sup> g/kg de mezcla de minerales:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (250);  $\text{KI}$  (0.2);  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (200);  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (100);  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1);  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.04);  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (0.1),  $\text{MnSO}_4$  (3);  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  (6);  $\text{ZnSO}_4$  (5);  $\text{Na}_2\text{Se}_2$  (0.05).

<sup>g</sup> Mezcla de vitaminas, Skretting, Canadá.

<sup>h</sup> Cloruro de colina 99%, MP Biomedicals, EUA.

<sup>i</sup> Stay-C, Rovimix.

<sup>j</sup>  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  99% Spectrum Chemical, EUA.

<sup>k</sup>  $\text{Si}_2\text{O}$  Acid washed, Riedel-deHaën, Alemania.

<sup>l</sup>  $\text{TiO}_2$  99%, Sigma-Aldrich, Canada.



**Figura 1.** Dietas experimentales elaboradas con los marcadores externos  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y  $\text{TiO}_2$ , para alimentación de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, con un tamaño de pellet de  $0.98 \text{ cm} \pm 0.35$ .

- **Sistema de cultivo**

Se utilizaron organismos juveniles de 2 meses de edad, con un peso y longitud promedio de  $4.0 \text{ g} \pm 0.02$  y  $98.93 \text{ mm} \pm 6.40$ , los cuales a esa edad presentan un tracto digestivo maduro (Mata-Sotres, 2010; Galaviz, 2011). Se distribuyeron al azar en 9 estanques cónicos de 500 L con 500 peces por unidad experimental, con un desagüe conectado a un sistema sedimentador de heces (Figura 2) y de recirculación de agua. El sistema de recirculación contó con filtros tipo Kuno de 5-20  $\mu\text{m}$ , con un filtro de luz UV y biofiltro para remover la materia orgánica. Así mismo, el sistema de cultivo estuvo dotado de un fraccionador de espuma para la depuración del agua, una bomba, un enfriador para regular la temperatura y un tanque reservorio. El flujo promedio de agua del sistema fue de 7.14 L/min, a una temperatura promedio de  $20.7 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  y un suministro de oxígeno de 6 mg/L.



- **Acondicionamiento de los organismos**

Los organismos se sometieron a un periodo de adaptación de 10 días a las dietas de prueba y a las condiciones del sistema de cultivo. Durante este periodo se realizó la limpieza diaria de heces y alimento no consumido mediante sifoneo directo. Una vez transcurridos los 10 días se efectuó una biometría general y se distribuyó equitativamente la biomasa de los peces por unidad experimental, con un peso promedio de 1996 g/unidad.

- **Colecta y conservación de muestras de heces.**

Los marcadores de digestibilidad ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y  $\text{SiO}_2$ ) se evaluaron por triplicado. Los tratamientos experimentales se distribuyeron aleatoriamente en las 9 unidades experimentales. Los organismos fueron alimentados a saciedad una vez al día durante 15 días, la colecta de las heces se efectuó mediante una columna de sedimentación que separa las heces del efluente del agua (sistema Guelph), (Cho et al., 1985; Cho & slinger 1979) a la primera hora y a las 18 horas postprandial (figura 2). Las heces se obtuvieron por drenado del sistema sobre un tamiz cilíndrico de 200  $\mu\text{m}$  de tamaño de malla (figura 3), seguido de un lavado para eliminar exceso de sales, para enseguida ser depositadas en bolsas de plástico con cierre (figura 4) y conservadas en congelación a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente las muestras se secaron por liofilizado y se almacenaron en recipientes de plástico herméticos hasta su análisis.



**Figura 2.** Sistema de colecta



**Figura 3.** Filtrado de heces



**Figura 4.** Separación por tratamiento.

- **Análisis de composición química proximal de alimentos formulados y heces.**

La determinación de humedad se efectuó por secado en estufa de convección a 100-110 °C por 3-4 horas (AOAC, 1995). El análisis del contenido de proteína cruda (N x 6.25) se realizó mediante el método microkjeldahl descrito por la AOAC (1995). Los lípidos totales se determinaron por extracción con cloroformo-metanol (2:1 v/v) según el método de Folch *et al.* (1957). Las cenizas se obtuvieron mediante calcinación durante 8-12 hrs. a 500° C (AOAC, 1995). El contenido de carbohidratos se estimó por diferencia al 100% (Jobling, 2001).

- **Determinación de contenidos de marcadores en los alimentos formulados y heces.**

Se realizaron los análisis del contenido de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) de acuerdo al método reportado para cenizas insolubles en ácido (CIA) por Olvera-Novoa (1993) y el procedimiento publicado por el Instituto de Salud Pública de Chile (2009), con modificaciones. En lo general la metodología consistió en pesar 1 g de muestra liofilizada en una cápsula de porcelana previamente calcinada y a peso constante. En mufla a 200 °C precalcinarse la muestra por 1 hora evitando que se inflame la muestra, posteriormente calcinar a 550 °C hasta la obtención de cenizas libres de carbono. Enfriar la cápsula con las cenizas y pesar su contenido. Transferir el residuo a un vaso de precipitado con 25 mL de ácido clorhídrico 3N, calentar a ebullición durante 5 minutos. Filtrar el digerido cuantitativamente a través del filtro de microfibras de vidrio libre de cenizas y enjuagar el vaso y el filtro con agua caliente. Colocar el filtro en una charola de aluminio o en un crisol e incinerar de nuevo a 550 °C, enfriar el filtro con las cenizas insolubles en ácido y posteriormente pesar. Se consideró el contenido del SiO<sub>2</sub> presente en la muestra como equivalente al de CIA, dicho contenido se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ óxido de silicio} = \frac{\text{peso de CIA (g)} \times 100}{\text{peso de muestra (g)}}$$

El método utilizado para determinar la concentración de óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) fue de acuerdo al reportado por Furukawa y Tsukahara (1966) y Olvera-Novoa *et al.* (1993). El procedimiento consistió en pesar 50 mg de muestra de heces o alimento previamente molido, colocarlo en un matraz microkjeldahl y adicionar 5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado, digerir el contenido a ebullición suave durante 30 minutos, hasta que desaparezcan los vapores amarillentos, al finalizar la solución presenta un color verde claro y no deberá desprender vapores ocres. Enfriar y agregar 3 mL de ácido perclórico (60-70%). Calentar nuevamente la muestra en el digestor y ebullición hasta que la solución vire de verde a amarillo limón. Enfriar el contenido, una vez frío se deberá formar un anillo rojizo en el borde del líquido, en caso de no formarse o si el líquido se torna verde nuevamente, volver a digerir hasta que el cambio sea permanente. Transferir el digerido a un matraz volumétrico de 25 mL, enjuagar el matraz de digestión varias veces con agua destilada y aforar. Ajustar el espectrofotómetro a 350 nm con un blanco de reactivos y leer la absorbencia de las muestras. La cantidad de óxido de cromo (mg) presente en la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de óxido de cromo (mg)} = A - (a/m)$$

A = absorbencia; m y a son constantes obtenidas a partir de la regresión lineal de la curva de calibración ( $y = 0.6176x + 0.065$ ,  $R^2 = 0.99$ ).

El % de óxido de cromo en la muestra se determinó con la siguiente expresión:

$$\% \text{ óxido de cromo} = 100(X/M)$$

Donde:

X = peso del óxido de cromo.

M = peso de la muestra.

El método utilizado para determinar la concentración de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) fue de acuerdo al reportado por Lyons (2009). El procedimiento consistió en pesar 0.01 g de  $\text{TiO}_2$  y transferirlo cuantitativamente a un vaso de 250 mL y añadir 20 mL de la solución de digestión (0.555g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado). Calentar en parrilla microKjeldahl hasta la ausencia de vapores blancos de  $\text{SO}_3$ , continuar el calentamiento hasta que en la solución se observen residuos de materia silícea. Enfriar y añadir 50 mL de agua destilada. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 100 mL y añadir 15 mL de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%, diluir con agua destilada al volumen del matraz y mezclar. El color del complejo  $\text{TiO}_2\text{-H}_2\text{O}_2$  se genera inmediatamente. Medir en espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm. La lectura debe obtenerse en el lapso de una hora desde que se genera el color. La cantidad de dióxido de titanio (mg) presente en la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de dióxido de titanio (mg)} = (A - (a/m))$$

A = absorbencia; a y m son constantes obtenidas de la regresión lineal de la curva de calibración ( $y = 11.794x + 0.0542$ ,  $R^2 = 0.972$ )

El % de dióxido de titanio en la muestra se determinó con la siguiente expresión:

$$\% \text{ dióxido de titanio} = (100(X/M))$$

Donde:

X = peso del dióxido de titanio.

M = peso de la muestra.

## **Determinación de coeficientes de digestibilidad aparente del alimento y de nutrientes.**

El cálculo del coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) del alimento con cada marcador se realizó mediante el uso de la siguiente ecuación (Fernandez *et al.*, 1999):

$$\% \text{ CDA alimento} = 100 - 100 (\% \text{ marcador en el alimento} / \% \text{ marcador en heces})$$

El cálculo de coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de nutrientes del alimento con cada marcador se determinó mediante el uso de la siguiente ecuación (Fernandez *et al.*, 1999):

$$\% \text{ CDA} = 100 - 100 \times [(\% \text{ MA} / \% \text{ MH}) / (\% \text{ NH} / \% \text{ NA})]$$

Donde: MA = marcador en el alimento; MH = marcador en las heces; NH = nutriente en las heces; NA = nutriente en el alimento.

- **Análisis estadístico.**

El diseño experimental fue aleatorio simple con 2 factores (marcador y tiempo). Se realizaron comparaciones entre las medias de los diferentes tratamientos en donde el factor a medir es el tipo de marcador interno y como segundo factor es el tiempo. Los resultados se analizaron a través del análisis de varianza (ANOVA) paramétrico de 2 vías, para determinar el efecto de las variables independientes o interacción entre ellas sobre la magnitud de las variables (Sokal y Rohlf, 1995), se utilizó el programa de estadística Sigmapstat® con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

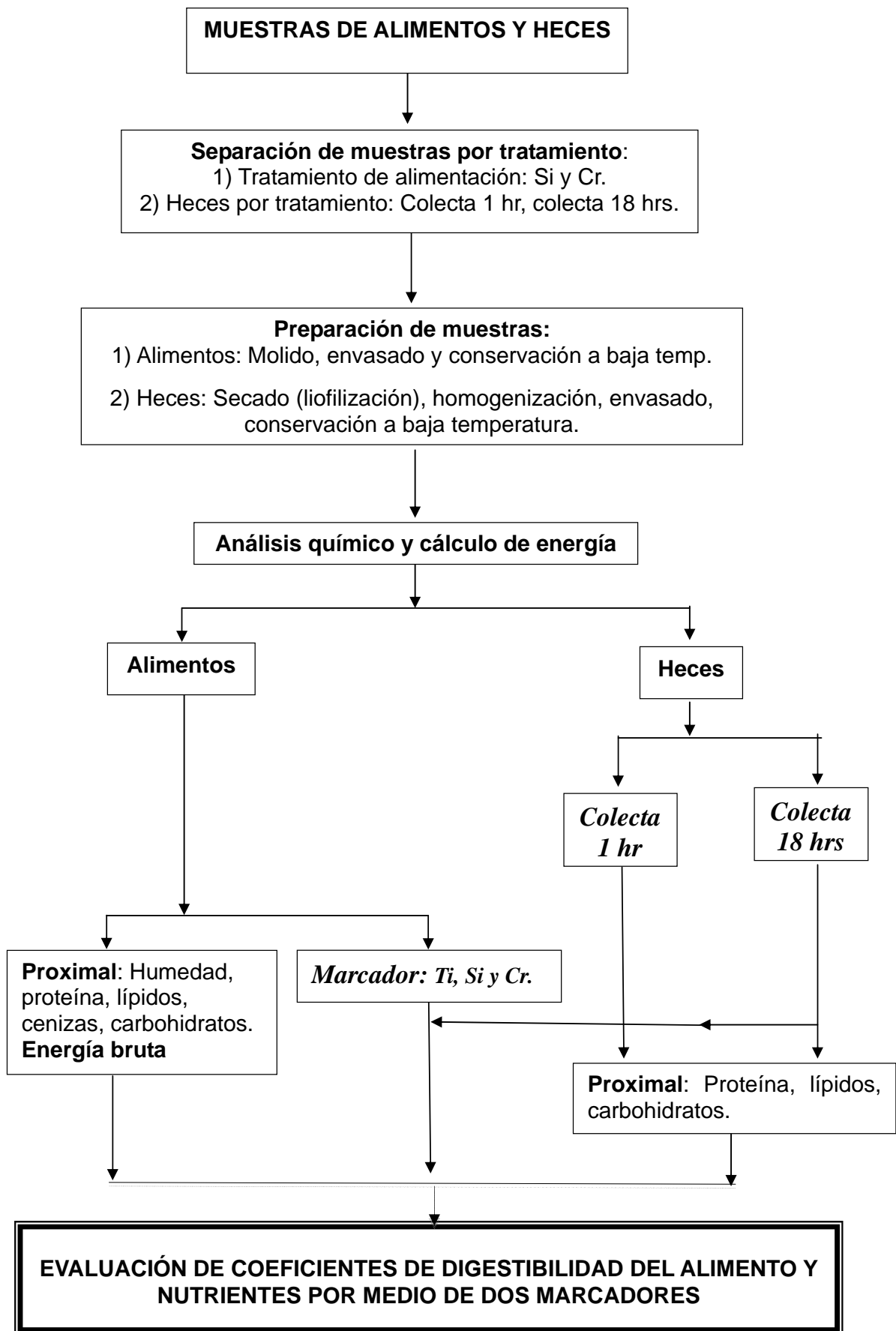


Figura 5.- Diagrama sinóptico de la metodología

## RESULTADOS.

Los resultados de la composición de las dietas se muestran en la Tabla II, en donde se observan valores similares entre las dietas que para proteína van de 53.3 a 55.2; para lípidos totales de 9.1 a 10.3; cenizas de 9.5 a 9.7. energía bruta de 21.1 a 21.4  $\text{kJ g}^{-1}$ , con una relación PC:EB de 25.2 a 25.9 mg de proteína por kJ. Los marcadores se encontraron entre 0.85 a 1.18 %.

**Tabla II.** Análisis químico (en base seca) de dietas experimentales con marcadores (OC: óxido de cromo; OS: óxido de silicio; OT; dióxido de titanio) para ensayos de digestibilidad con juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

Composición (g/100 g)	Dietas		
	OC	OS	OT
Proteína cruda	55.21	53.28	54.67
Lípidos totales	10.33	9.72	9.13
Cenizas	9.67	9.60	9.50
Carbohidratos	24.79	27.39	26.69
Energía bruta ( $\text{kJ g}^{-1}$ )	21.39	21.10	21.10
Relación PC:EB ( $\text{mg kJ}^{-1}$ )	25.81	25.20	25.89
Marcador	0.98	1.18*	0.85

\* Determinado como cenizas insolubles en ácido.

Se analizó el contenido proximal de las heces a diferentes horas de colecta, los resultados se muestran en la Tabla III. El contenido de proteínas, lípidos, marcador y energía bruta para óxido de cromo no presentó diferencias significativas entre 1 y 18 hrs, en cambio, las cenizas y carbohidratos con óxido de cromo presentaron diferencias significativas entre colectas, en donde el valor del contenido de cenizas disminuye a 18 hrs y el valor de carbohidratos aumenta a las 18 hrs. En la dieta experimental con óxido de silicio, el contenido de cenizas, carbohidratos y energía bruta no presentaron diferencia significativa entre ambas horas de colecta, el contenido de proteína y marcador disminuyó en la colecta de 18 hrs, y el contenido lípidos aumentó en la colecta de 18 hrs.



La composición química de las heces con dióxido de titanio muestra que el contenido de cenizas, carbohidratos y energía bruta no presentaron diferencias significativas entre colectas, en cambio el contenido protéico en las heces tuvo un efecto significativo en la colecta de 18 hrs, disminuyendo su contenido, los lípidos y el marcador también tuvo un efecto significativo en la colecta de 18 hrs, aumentando considerablemente.

**Tabla III.** Composición química (g/100 g, base seca) en heces de juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) alimentados con dietas experimentales conteniendo tres tipos de marcadores (OC: óxido de cromo; OS: óxido de silicio; OT: dióxido de titanio) de colectadas a la 1<sup>a</sup> y 18<sup>a</sup> hora postprandial. Media  $\pm$  error estándar, n=3.

Constituyente	Dieta					
	OC		OS		OT	
	1 <sup>a</sup> h	18 <sup>a</sup> h	1 <sup>a</sup> h	18 <sup>a</sup> h	1 <sup>a</sup> h	18 <sup>a</sup> h
Proteína cruda	18.67 $\pm$ 0.39	13.97 $\pm$ 0.97	18.21 $\pm$ 1.04	14.10 $\pm$ 0.28	16.91 $\pm$ 0.57	13.86 $\pm$ 0.36
Lípidos totales	11.51 $\pm$ 0.74	11.37 $\pm$ 0.49	10.09 $\pm$ 0.57	13.43 $\pm$ 0.33	10.21 $\pm$ 0.44	12.70 $\pm$ 0.14
Cenizas	22.94 $\pm$ 0.60	19.55 $\pm$ 0.28	23.82 $\pm$ 0.42	22.13 $\pm$ 0.27	24.18 $\pm$ 0.35	22.47 $\pm$ 0.40
Carbohidratos	46.88 $\pm$ 0.25	55.30 $\pm$ 0.76	47.88 $\pm$ 1.67	50.35 $\pm$ 0.31	48.70 $\pm$ 0.60	50.97 $\pm$ 0.44
Marcador	3.48 $\pm$ 0.04	3.43 $\pm$ 0.05	5.70 $\pm$ 0.27	5.10 $\pm$ 0.13	2.29 $\pm$ 0.06	2.47 $\pm$ 0.02
Energía bruta (kj/g)	17.02 $\pm$ 0.24	17.25 $\pm$ 0.15	16.62 $\pm$ 0.21	17.29 $\pm$ 0.05	16.40 $\pm$ 0.19	17.05 $\pm$ 0.05

Se compararon los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas, sólidos totales y energía bruta para la alimentación de los peces con las dietas de óxido de cromo, óxido de silicio y dióxido de titanio con dos colectas de heces a 1<sup>a</sup> y 18<sup>a</sup> hora postprandial (Tabla IV). De los resultados obtenidos el tiempo presenta un efecto significativo ( $p = <0.001$ ) en los resultados de CDA para proteínas, lípidos y carbohidratos. El marcador también mostró un efecto significativo ( $p = <0.001$ ) para proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas, sólidos totales y energía bruta. No se presentó una interacción estadísticamente significativa entre los

factores tiempo y marcador con relación a los datos, excepto para los valores de carbohidratos en donde si se determinó significancia entre factores ( $p = <0.001$ ).

Los CDA de proteínas con óxido de cromo fue mayor en la colecta de 18 hrs. Los sólidos totales, los lípidos, los carbohidratos y la energía bruta con óxido de cromo presentaron valores menores significativamente en la colecta de 18 hrs, el único valor que no mostró diferencia significativa en la colecta de 18 hrs fue el CDA de cenizas. Para el marcador óxido de silicio los CDA de sólidos totales, cenizas, carbohidratos, y energía bruta son similares entre colectas sin diferencias significativas, el CDA para lípidos en la colecta a 18 hrs mostró valores significativamente menores que a la 1a hora, y el CDA para proteínas presentó valores significativamente mayores en la colecta de 18 hrs.

El alimento con el marcador dióxido de titanio muestra que los CDA de carbohidratos y energía bruta no presentaron diferencias significativas entre colectas, los CDA de sólidos totales proteínas y cenizas aumentaron significativamente en la colecta de 18 horas, en tanto el CDA de lípidos disminuyó significativamente en dicha colecta..

**Tabla IV.** Coeficientes de digestibilidad aparente (%) de constituyentes de dietas experimentales estimados con tres marcadores (OC: óxido de cromo; OS: óxido de silicio; OT: dióxido de titanio) en ensayo de alimentación con juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) a la 1<sup>a</sup> y 18<sup>a</sup> hora postprandial. Media  $\pm$  error estándar, n=3. <sup>a,b,c,d</sup> Valores en la misma fila con distinto superíndices son significativamente diferentes (p<0.05)

Constituyente	Dietas					
	OC		OS		OT	
	1 <sup>a</sup> h	18 <sup>a</sup> h	1 <sup>a</sup> h	18 <sup>a</sup> h	1 <sup>a</sup> h	18 <sup>a</sup> h
Sólidos totales	77.89 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	74.82 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	78.67 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	77.24 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	63.23 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	65.57 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>
Proteína cruda	92.52 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	93.71 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	92.71 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	93.98 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	88.63 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>	91.27 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>
Lípidos totales	75.37 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	72.30 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	77.88 $\pm$ 1.31 <sup>c</sup>	68.58 $\pm$ 1.27 <sup>d</sup>	58.91 $\pm$ 0.80 <sup>e</sup>	49.38 $\pm$ 0.99 <sup>f</sup>
Cenizas	47.54 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup>	49.08 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	47.44 $\pm$ 3.12 <sup>a</sup>	47.56 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	6.40 $\pm$ 1.82 <sup>b</sup>	19.81 $\pm$ 1.56 <sup>c</sup>
Carbohidratos	58.18 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>	43.81 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>	62.73 $\pm$ 2.21 <sup>a</sup>	58.18 $\pm$ 1.69 <sup>a</sup>	32.92 $\pm$ 1.30 <sup>c</sup>	34.25 $\pm$ 1.28 <sup>c</sup>
Energía bruta(kj/g)	82.41 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	79.68 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	83.34 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	81.64 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	71.45 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>	72.19 $\pm$ 0.54 <sup>c</sup>

En la Tabla V se muestra, la ración de alimento y la distribución de la biomasa entre estanques al inicio del bioensayo y al término del mismo.

**Tabla V.-** Evaluación de la biomasa inicial y final.

EVALUACIÓN DE BIOMASA INICIAL Y FINAL						
	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>			SiO <sub>2</sub>		
	U.2	U.11	U.12	U.6	U.9	U.10
Biomasa inicial* (g)	1999.62	2000.92	1999.74	1961.78	1997.41	2002.02
Alimento/día	39.99	40.02	39.99	39.24	39.95	40.04
Biomasa Final** (g)	3423.00	3370.58	3372.39	2905.03	3324.45	3123.99

\*09-julio-2010

\*\*27-julio-2010

**Tabla VI.-** Análisis de varianza de dos vías entre tiempo y marcador, con un nivel de confianza de 95.

	Tiempo	Marcador	Tiempo y marcador
Sólidos totales	<b>P = 0.162</b>	P = < 0.001	<b>P = 0.020</b>
Proteínas	P = < 0.001	P = < 0.001	<b>P = 0.013</b>
Lípidos	P = < 0.001	P = < 0.001	<b>P = 0.015</b>
Cenizas	<b>P = 0.008</b>	P = < 0.001	<b>P = 0.011</b>
Carbohidratos	P = < 0.001	P = < 0.001	P = < 0.001
Energía bruta	<b>P = 0.028</b>	P = < 0.001	<b>P = 0.045</b>

## DISCUSIÓN

En los tres tratamientos los peces aceptaron las dietas formuladas, ya que al drenar las heces no se observó alimento sin consumir. En esta tesis se utilizó un sistema para la remoción de heces que consistió en un sedimentador que se encuentra en la salida de drenaje del estanque, sin tener contacto directo con el flujo de agua nos asegura que el lavado sea mínimo. Este tipo de sistemas han sido utilizados desde hace mucho tiempo con resultados positivos (Bureau *et al.*, 1999; Cho *et al.* 1985; Fontainhas-Fernandes., *et al.*, 1999). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la digestibilidad aparente entre las tomas de 1 y 18 hrs. Esto significa que aun siendo este sedimentador el adecuado, las muestras de heces deberán ser colectadas con cierta periodicidad para evitar su lavado (Kitagima, 2010). Por otro lado la relación organismos y cantidad de heces fue adecuada, ya que se logró recoger suficiente para llevar a cabo los análisis.

Para poder establecer cual de los marcadores es el correcto sería necesario conocer los valores de digestibilidad reales de las dietas aquí utilizadas, dato que no se cuenta con el. Sin embargo, en este trabajo se utilizó una dieta de referencia formulada con ingredientes de alta digestibilidad. Es así que se formuló con una harina de pescado LT (baja temperatura por sus siglas en inglés) provenientes de Canadá por la Cia Skretting que constituyó el 65 % en las dietas. Por otro lado se utilizaron otros productos de alta digestibilidad como la harina de krill de la Cia. Skretting de Canadá. Es así que en este trabajo se postuló que el marcador que nos diera la digestibilidad más alta sería el que acercara a la realidad. Bajo este argumento, podríamos decir que tanto el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  como el  $\text{SiO}_2$  resultaron ser buenos marcadores para materia seca y proteínas.

Los resultados aquí reportados, muestran valores de Coeficientes de Digestibilidad Aparente (CDA) utilizando distintos marcadores externos. En donde los valores de CDA en las heces son similares con  $\text{SiO}_2$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en la colecta de 1 hora, tanto para materia seca como proteína mientras que, para lípidos los valores resultaron significativamente diferentes entre dichos marcadores, esto sugiere que los lípidos por su naturaleza hidrofóbica y su reducida solubilidad con los otros nutrientes de la dieta, es más fácil su desprendimiento de la misma y por lo tanto presenta valores diferentes entre marcadores. Sin embargo los lípidos totales resultaron tener una mayor digestibilidad con el OS, lo cual podría ser una ventaja en su medición. Los valores para cenizas muestran CDA similares entre  $\text{SiO}_2$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en ambas colectas, en cambio para  $\text{TiO}_2$  muestran los valores más bajos para cenizas y demás constituyentes de las heces, esto podría ser atribuible al efecto de interferencia del óxido de titanio en el proceso de evacuación del contenido del estómago como ha sido reportado en tilapia (Richter *et al.*, 2003).

La comparación entre marcadores fue mayor en  $\text{SiO}_2$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  ya que presentaron valores más similares, teniendo en cuenta que los CDA de las heces con  $\text{TiO}_2$  muestran los valores más bajos de los tres marcadores, sin ninguna similitud entre los otros dos marcadores, similar a lo reportado por Vanderberg y de la Noue (2001), en donde los marcadores  $\text{SiO}_2$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  tienen valores similares entre ellos para proteína y energía bruta, sin ninguna similitud con  $\text{TiO}_2$  que tiene valores mayores con la técnica de colecta por columna. Esto quiere decir que la determinación de CDA con  $\text{SiO}_2$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  fue realizada correctamente ya que su comparación con otros estudios en peces es similar, como Waterup & Macracken (1998) que reportan valores de CDA de  $\text{TiO}_2$  menores que  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . No obstante para descartar con seguridad el uso de  $\text{TiO}_2$  como marcador en estudios de digestibilidad para *Totoaba macdonaldi*, se requieren futuros estudios implementando métodos de análisis alternativos.

Los factores que pueden ocasionar la sobreestimación en el índice de CDA es la lixiviación de los nutrientes (Cho, 1985) y el paso anómalo del marcador por el intestino (Ramsden *et al.*, 2009). La digestibilidad aparente también puede ser afectada por el método de colecta utilizado, ya que la lixiviación y absorción incompleta es un problema en los estudios de digestibilidad, debido a la pérdida de constituyentes de las heces que se encuentran en contacto con el agua por largos periodos de tiempo. El método de colecta utilizado en este estudio es mediante una columna de sedimentación que separa las heces del efluente del agua (sistema Guelph) (Cho *et al.*, 1985; Cho & slinger 1979), que junto con el sistema recolector rotatorio son los más recomendados para la colecta de heces (Gropp, 1994), ya que las heces están el menor tiempo posible en contacto con el agua, lo cual nos da como resultado en este estudio valores de CDA de sólidos totales, cenizas y energía bruta que no presentan diferencia significativa entre tratamientos con relación al tiempo de colecta de heces, similar a lo reportado para sólidos totales y energía bruta por *Allan et al* (1999) y Kitagima (2010). También el CDA para la proteína resultó tener valores similares a lo reportado por Kitagima (2010), mostrando diferencias significativas entre colectas, al igual que lípidos y carbohidratos. Los índices del CDA de proteínas, lípidos y carbohidratos presentaron diferencias significativas al transcurrir el tiempo de colecta, similar a lo reportado en proteína con el bagre de canal *Ictalurus punctatus* (Kitagima, 2010) y en proteínas y lípidos en trucha arcoiris *Salmo gairdneri* (Windell *et al.*, 1978), debido al lavado por lixiviación de nutrientes de las heces en contacto prolongado con el agua. La relación entre el tiempo de colecta y el marcador solo presenta diferencia significativa en carbohidratos, los cuales se calcularon por diferencia al 100%, lo cual es un factor a considerar en la variación de los resultados, ya que se acumulan las variaciones de los constituyentes de la sumatoria para la resta, lo contrario a todos los demás macronutrientes, ya que se analizan independientemente implementando diferentes técnicas de laboratorio.

El uso de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  ha sido estudiado en peces sugiriendo diversas razones por la cual no debe ser utilizado el óxido de cromo en estudios de digestibilidad, ya que se ha reportado que modifica la utilización de sales minerales en dorada *Sparus aurata* (Fernandez *et al.*, 1999) y se conoce que tiene efectos biológicos y metabólicos en trucha ártica (Ringo, 1993), en el bagre de canal (Ng & Wilson, 1997) y en tilapia (Shiau & Liang, 1995; Shiau & Shy, 1998). Sin embargo para eliminar el uso de óxido de cromo en *Totoaba macdonaldi* es necesario realizar estudios relacionados con su efecto biológico, metabólico y de utilización con nutrientes específicos.

Existen varias razones que se encuentran en debate sobre si el uso de  $\text{SiO}_2$  como marcador digestivo en peces es confiable, ya que se encuentran estudios en tiburón limon *Negaprion brevirostis*, que reportan su paso en el tracto gastrointestinal mas lento que la digesta (Wetherbee and Gruber, 1993). Los incrementos en la concentración de CIA pueden enfatizar estos cambios en una proporción que no solamente este puede ser el factor de confusión, sino que otros materiales no digeribles como la quitina o fibra pueden agregar volumen a la digesta, resultando en un paso diferente de los compuestos solubles e insolubles, este fenómeno se presenta en el tambor rojo, en la lobina híbrida rayada y otros peces carnívoros. (Li *et al.*, 2008). En cambio otros estudios reportan el uso de CIA como un marcador inerte ideal para digestibilidad y eficiencia de absorción en numerosos peces como en la trucha arcoíris (Atkinson, 1984), tilapia *Oreochromis aureus* (Goddard & Mclean, 2001) y el bagre de canal *Ictalurus punctatus* (Shahat, 1993), también se reportan estudios en el humano (Rowan *et al.*, 1991) y en pollos (Cheng & Coon, 1990). El uso de  $\text{SiO}_2$  se sugiere como el más adecuado para estudios de digestibilidad en *Totoaba macdonaldi*, a pesar del debate existente sobre su uso, presenta los valores mas confiables de los tres marcadores, ya que con  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  se observan similitudes en diversos estudios donde reportan diversas razones por la cual no debe ser utilizado el óxido de cromo en estudios de digestibilidad, y a comparación de  $\text{TiO}_2$  que muestra los valores más bajos y sin ninguna similitud con otros estudios en peces.



Bajo las condiciones experimentales del presente estudio el uso de dióxido de titanio como marcador no presentó resultados que lo mostraran como un compuesto útil para la determinación de coeficientes de digestibilidad en totoaba, uno de los factores que posiblemente influyó en la baja sensibilidad del marcador, es la dificultad para una distribución homogénea en su mezcla con la dieta, lo cual ha sido reportado en estudios con trucha arcoiris (Weatherup y McCracken, 1998; Vanderberg y De la Noue, 2001). Otro factor que posiblemente afectó la digestibilidad, es el tránsito anómalo dentro del tracto digestivo, lo cual podría ocasionar una absorción deficiente de los nutrientes, similar a lo reportado en trucha por Ramsden *et al.* (2009). Cuando se habla de un tránsito anómalo se refiere a que el alimento atravieza el tracto intestinal en menor tiempo, lo cual da lugar a una digestión incompleta y menor tiempo para que los nutrientes sean absorbidos.

Los resultados de los estudios de digestibilidad pueden variar de acuerdo a diferencias en el ambiente de cultivo, perfil nutricional o la composición de las dietas experimentales (Li *et al.*, 2008). Por ejemplo, en algunos casos donde los estudios de digestibilidad son en agua salada, cuando las heces están secas las sales contenidas en el agua que contenía la humedad del alimento y heces pueden ocasionar la subestimación de digestibilidad. Es decir que la cantidad que se absorbe en el alimento comparada con la humedad que pueden contener las heces son diferentes, donde al secarse las heces incluyen el contenido de las sales y sobreestime el peso de las heces con respecto a la sal contenida en el alimento (Hajen *et al.*, 1993), dicho factor es descartado ya que se lavaron con agua dulce para eliminar el exceso de sales, lo cual se asume que la contaminación en las heces por sales sería insignificante.

## CONCLUSIONES

Los resultados del estudio sugieren que el uso de  $\text{SiO}_2$  ofrece diversas ventajas sobre  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y  $\text{TiO}_2$ , al ser de bajo costo y de fácil medición con equipo básico de laboratorio, es un marcador adecuado en estudios de digestibilidad en *Totoaba macdonaldi*.

No existen diferencias significativas en la composición de los marcadores en la heces a una colecta de 1 hr y 18 hrs, lo cual nos dice que ambos marcadores son estables en las heces hasta por 18 horas.

Los CDA en la heces para nutrientes muestran que las proteínas, lípidos y carbohidratos son mas propicios a una lixiviación de nutrientes, ya que presentan una diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) conforme al tiempo de colecta, los CDA para sólidos totales ( $p = 0.162$ ), cenizas ( $p = 0.008$ ), y energía bruta ( $p = 0.028$ ), no tienen efecto significativo en la colecta a 18 hrs, por lo tanto, se recomienda una colecta de las heces a 1 hr postprandial para evitar lixiviación proteica, lipídica y de carbohidratos.

El uso de marcadores digestivos en *T. macdonaldi*, promueve el futuro uso de los mismos con nutrientes específicos, propiciando avances en estudios de nutrición en *T. macdonaldi* ya que son escasos en esta especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguado, F., Martinez, F.J., Garcia-Garcia, B., 2004. In vivo total nitrogen and total phosphorous digestibility in Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus thynnus* Linnaeus, 1758) under industrially intensive fattening conditions in Southeast Spain Mediterranean coastal waters. *Aquaculture Nutrition* 10, 413–419.
- Allan L. G., Rowland J. S., Parkinson S. Stone A. J., Jantrarotai W. 1999. Nutrient digestibility for juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*: development of methods. *Aquaculture* 131-145.
- Allan, G., Parkinson, S., Booth, M., Stone, D., Rowland, S., Frances, J., and Warner-Smith, R. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients, *Aquaculture* 186:293-310.
- A.O.A.C., 1995. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Atkinson, J.L., Hilton, J.W., Singer, S.J., 1984. Evaluation of acid insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 1384–1386.
- Austreng, E., 1978. Digestibility determinations in fish using chromic oxide marker and analysis of contents from different segments of the gastro-intestinal tract. *Aquaculture*, 13, 265-272.
- Austreng, E., Storebakken, T., Thomassen, M.S., Refstie, S. Thomassen, Y., 2000. Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers used to estimate apparent digestibility in salmonids. *Aquaculture*, 188, 65–78.
- Bolasina, S. N, Fenucci, J. L. 2005. Digestibilidad aparente de proteína cruda y lípidos en la brótola, *Urophycis brasiliensis* (Kamp, 1858) (Pisces: Gadiformes), alimentada con reemplazos parciales de harina de soja y harina de carne. *Rev. Biol. Mar. y Oceanografía* 40(2), 127–131
- Bordner C.E., D'Abramo R. & Conklin D.E., 1983. Assimilation of nutrients by cultured hybrid lobsters (*Homarus sp.*) fed experimental diets. *Journal of the World Mariculture Society* 14, 11-24.

- Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y., 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 180, 345-358.
- Cheng, T. K. and C. N. Coon. 1990. Calcium digestibility studies utilizing acid-insoluble ash measurements. *Poultry Science* 69:2228–2230.
- Cho, C.Y., Cowey, C.B. Watanabe, T., 1985. Methodological approaches to research and development. In: *Finfish Nutrition in Asia* (Cho, C.Y., Cowey, C.B. & Watanabe, T. eds), pp. 10-80. IDRC, Ottawa, Canada.
- Cho, C.Y. Slinger, S.J. (1979) Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. In: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Halver, J.E. & Tiews, K. eds), Vol. 2, pp. 239-247. Heenemann-Verlagsgesellschaft, Berlin.
- Cho, C.Y., Slinger, S.J., Bayley, H.S., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B(1), 25-41.
- Chong, A.S.C., Hashim, R., Ali, A.B., 2002. Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using *in vivo* and *in vitro* methods. *Aquac. Nutr.* 8, 229-238.
- Choubert G., De La Noue, J; Luquet, P., 1982. Digestibility in fish: improved device for the automatic collection of faeces. *Aquaculture* 29, 185-189.
- Cisneros-Mata, M. A., G. Montemayor-López, and M. J. Román-Rodríguez. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology* 9: 806–814.
- De Silva S.S., Deng D.F. & Rajendram V., 1977. Digestibility in goldfish fed diets with and without chromic oxide and exposed to sublethal concentrations of cadmium, *Aquac Nutr* 3. 109-114.
- Dimes, L. E., Haard, N. F., 1994. Estimation of protein digestibility-I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 349-362.
- Edin, H., 1918. Orienterance försoök öfver anvä'ndbarheten av en på 'ledkroppsprincipen' grundad metod att bestä'mma en foderblandings sma'ltbarhet. *Cent. Forsoksvasendet Jordbruk*.

- Stockholm Medd. 165, 1–2.
- Fagenbro, O., Jauncey, K., 1993. Chemical and nutritional quality of raw, cooked and SALT fish silages. *Food Chem.* 48, 331-335.
- FAO, 1994. Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuícolas. Departamento de Pesca y acuicultura de la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 269 pp.
- FAO, 2009. El estado mundial de la pesca 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 196 pp.
- Fernandez, F., Miquel, A.G., Martinez, R., Serra, E., Guinea, J., Narbaiza, F.J., Caseras, A., Baanante, I. V., 1999. Dietary chromic oxide does not affect the utilization of organic compounds but can alter the utilization of mineral salts in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *J. Nutr.* 129, 1053–1059
- Folch J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1975. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 496-509.
- Fontainhas-Fernandes, A., Gomes, E., Reis Henriques, M.A., Coimbra, J., 1999. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia : digestibility and grow performance. *Aquacult. Int.* 7, 57-67.
- Forster J.R.M. & Gabbott P.A., 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of the Marine Biology Association.* UK 51, 943-961
- Furukawa, H., Tsukahara, H., 1966. On the acid digestion method for the determination of chromium oxide as an index substance in the study of digestibility of fish fed. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 32(6), 502-508.
- Furuichi, Y., Takahashi, T., 1981. Evaluation of acid insoluble ash as a marker in digestion studies. *Agric. Biol. Chem.*, 45 2219-2224.

- Gaaviz-Espinoza, M.A., 2011. Expresión y actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo de *Totoaba macdonaldi*, *Atractoscion nobilis* y *Lutjanus guttatus* bajo condiciones de cultivo. Tesis de Doctorado en Ciencias en Oceanografía Costera, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, BC.
- Glencross, B.D., Booth, M., Allan, G.L., 2007. A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquac. Nutr.* 13, 17–34.
- Glindemann, T., Tas, B.M., Wang, C., Alvers, S., Susenbeth, A., 2009. Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Amin. Feed Sci. Technol.* 152, 186-197
- Gobierno de Chile, Instituto de Salud Pública, 2009. Procedimiento determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en alimentos. Método gravimétrico. PRT-711.02-009. Laboratorio Nutrientes, Aditivos y Contaminantes. Fecha de Emisión: 07-05-2009.
- Goddard, J.S., McLean, E. (2001). Acid-insoluble ash as an inert reference material for digestibility studies in tilapia, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 194, 93-98.
- Gomes da Silva, J., Oliva-Teles, A., 1998. Apparent digestibility coefficient of feedstuffs in seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquat. Living. Resour.* 11(3), 187-191.
- Gropp J. M., Tacon A.G.J., 1994. Report on the workshop on methodology for determination of nutrient requirements in fish, *Eur. Inland Fish. Advisory Com. EIFAC Occasional Paper* 29, 177-186.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Metailler, R., 2001. *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*. Springer. Chichester, UK, 408 pp
- Hajen W.E., Beames R.M., Higgs D.A., Dosanjh B.S. 1993. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. 1. Validation technique, *Aquaculture* 112; 321-332.
- Hanley, F., 1987. The digestibility of foodstuffs and the effects of feeding selectivity on digestibility determinations in tilapia, *Oreochromis niloticus* L., *Aquaculture* 66, 163-179.

- Helfman, G. S. Collete, B. B.Facey, D. E. 1997. The Diversity of Fishes. Wiley-Blackwell, Malden, Massachusetts, 528 pp.
- Jagger, S., Wiseman,J., Cole, D. J. A., 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, 129-139.
- Jobling, M., 1983. A short review and critique of methodology used in fish growth and nutrition studies. J. Fish Biol 23, 685-703.
- Jobling, M., 2001. Nutrition partitioning and the influence of feed composition on body composition. In: Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), Food Intake in Fish. Blackwell Science, UK, pp. 354–375.
- Kim, J.C., Simmins, P.H., Mullan, B.P, Plusk, J.R., 2005. The effect of wheat phosphorus content and supplemental enzymes on digestibility and growth performance of weaner pigs. Anim. Feed Sci. Technol.118, 139–152.
- Kitagima R. E., Fracalossi M. D. 2010. Validation of a methodology for measuring nutrient digestibility and evaluation of comercial feeds for channel catfish. Brazil. Sci. Agric. V. 67, n.5, p.611-615.
- Kluth, H., Rodehutschord,M., 2006. Comparison of amino acid digestibility in broiler chickens, turkeys and Pekin ducks. Poult. Sci. 85, 1953-1960.
- Lara Flores, M., Briones, L., Olvera Novoa, M., 2002. Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Leavitt D.F., 1985. An evaluation of gravimetric and inert marker techniques to measure digestibility in the America lobster. Aquaculture. 47, 131-142.

- Lee SM. 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 207, 79-95.
- Li, P., A. W. Kenneth and D. M. Gatlin III. 2008. Evaluation of acid-insoluble ash as an indicator for digestibility determination with red drum, *Scianops ocelattus*, and hibrid striped bass, *Morone chrysops x M. Saxatilis*. *J. World Aquaculture Society* 39(1), 120-125.
- Lied, E., Julshamn, K. & Braekkan, O. R., 1982. Determination of protein digestibility in Atlantic cod (*Gadus morhua*) with internal and external indicators chromium oxide, titanium oxide. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 854-861.
- Littell, P., Henry, R., Lewis, A. J., Ammerman, C. B., 1997. Estimation of relative bioavailability of nutrients using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 75, 2672-2683.
- Lloyd, L.E., Rutherford, B.E., Crampton, E.W., 1955. A comparison of titanio oxide and chromic oxide as index materials for determining apparent digestibility. *J. Nutr.* 56, 265-271.
- Lyons, A.V., 2009. Determination of titanium dioxide (Revision of T 627 om-02). TAPPI Test Method. <http://www.tappi.org/content/tag/sarg/t627.pdf> (03/02/2012).
- Manríquez J.A. & J.J. Romero, 1993. *Determinación de la digestibilidad del alimento utilizado en la salmonicultura. Una herramienta para su certificación ambiental.* p. 8-9. Seminario Internacional Acuicultura y Medio Ambiente. Santiago, 2-3 septiembre de 1993. Fundación Chile. 189 pp.
- Marais, J.P., 2000. Use of markers. En: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*, J.P.F. D'Mello (ed.), CAB Publishing, Wallingford, U.K., pp. 255-277.
- Mata-Sotres, J.A., 2010. Evaluación del éxito en el destete en larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y jurel cola amarilla (*Seriola lalandi dorsalis*) utilizando el crecimiento, supervivencia y/o tasas de ingestión. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura, CICECSE, Ensenada, BC., 76 p.
- Montaño-Vargas, J., Shimada, A., Vásquez C., Viana, M.T., 2002. Methods of measuring feed digestibility in the green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture*. 213, 339-34.



- Morales, A.E., Cardenete, G., Sanz, A., de la Higuera, M., 1999. Re-evaluation of crude fibre and acid-insoluble ash as inert markers, alternative to chromic oxide, in digestibility studies with rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 179, 71-79.
- Myers, W. D., Ludden, P. A., Nayigihugu, V., Hess, B. W., 2004. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.* 2004. 82:179–183.
- Myers, W.D., Ludden, P.A., Nayigihugu, V., Hess, B.W., 2006. Excretion patterns of titanium dioxide and chromic oxide in duodenal digesta and feces of ewes. *Small Rumin. Res.* 63, 135-141.
- Newman M.W. & Lutz P.L., 1982. Temperature effects on feed ingestion and assimilation efficiency of nutrients by the Malaysian prawn. *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of the World Mariculture Society.* 13, 95-103.
- Ng, W. & Wilson, R.P. (1997) Chromic oxide inclusion in the diet does not affect glucose utilization or chromium retention by Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.*, 127, 2357–2362.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-ECOL- 059-91) Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y faunas silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión, o cambio-lista de especies en riesgo.
- Disponible en: [www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/normas](http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/normas).
- Nose, T., 1960. On the digestion of food protein by goldfish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* g.) *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.* 10, 11–22.
- Nose, T., 1961. Determination of nutritive value of food protein on fish: I. On the determination of food protein utilization by carcass analysis. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.* 11, 29–42.
- Nose, T. (1967) On the metabolic fecal nitrogen in young rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 17, 97-105.
- Ono, R.D., Williams, J.D., Wagner, A., 1983 *Vanishing Fishes of North America*. Stone Wall Press, Inc., Washington, DC 257 pp.

- Olvera-Novoa, M. A., Martínez-Palacios, C. A., Real de León, E., 1993. Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia GCP/RLA/102/ITA, Proyecto Aquila II, Documento de Campo N° 7, México, D.F.
- Ramsden, Christopher S., Smith T. J., Shaw, J., Handy, Richard D. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Journal of Ecotoxicology*. 18, 939-951.
- Richter, H., Lückstädt, C., Focken, U., Becker, K., 2003. Investigating the evacuation of pelleted feed and the suitability of titanium (IV) oxide as a feed marker for gut kinetics in Nile tilapia. *J. Fish Biol.* 63, 1080–1099.
- Ringø, E. (1993). Does chromic oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) affect faecal lipid and intestinal bacterial flora in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)? *Aquaculture and Fisheries Management* 24, 767-776.
- Roselund, G., Njaa, L.F., 1982. Protein digestibility in rats determined with  $\text{TiO}_2$  and  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , and comparisons with a rapid enzyme test. *Acta Agric. Scand.* 32, 115-121.
- Rowan, A. M., P. J. Moughan, and M. N. Wilson. 1991. Acid-insoluble ash as a marker compound for use in digestibility studies with humans. *Journal of Science of Food and Agriculture* 54:269–274.
- Ruiz-Dura M., F., 1985. Recursos Pesqueros de las Costas de México. Ed Limusa. 208 pp
- Saavedra, M., Beltran, M., Pousão-Ferreira, P., Dinis, M.T., Blasco, J., Conceição, L.E.C., 2007. Evaluation of bioavailability of individual amino acids in *Diplodus puntazzo* larvae: Towards the ideal dietary amino acid profile. *Aquaculture* 263, 192-198.
- Satoh, S., Cho, C.Y., Watanabe, T., 1992. Effect of faecal retrieval timing on digestibility of nutrients in rainbow trout diet with the Guelph and TUF feces collection systems. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1123 – 1127.
- Sales, J., 2008. The use of linear regression to predict digestible protein and available amino acid contents of feed ingredients and diets for fish. *Aquaculture* 278, 128–142.

- Schurch, A. F., L. Lloyd, E., Crampton, E. W., 1950. The use of chromic oxide as an index for determining digestibility of a diet. *Journal of Nutrition* 41 (4), 629-636.
- Shahat, T. M. 1993. Digestibility determination in Nile catfish fingerlings using internal and external markers. *Veterinary Medical Journal Giza* 41:83–91
- Shiau, S.Y., Lin, S.F., 1993. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*). *J. Nutr.* 123, 1747- 1753.
- Shiau, S., Liang, H. (1995) Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* · *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in diet. *J. Nutr.*, 125, 976–982.
- Shiau, S., Shy, S. (1998) Dietary chromic oxide inclusion level required to maximize glucose utilization in hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* · *O. aureus*. *Aquaculture*, 161, 357–364.
- Short, F.J., Gorton, P., Wiseman, J., Boorman, K.N. 1995. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal Feed Science Technology* 59, 215-221.
- Sigurgisladottir, S., Lall, Parrish, C.C. & Ackmoan, R.G. 1990. Digestibility of dietary lipids in Atlantic salmon, Using cholestane as a digestibility marker. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.*, 90, 41-44.
- Sklan, D., Prag, T., Lupatsch, I., 2004. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their prediction in diets for tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (Teleostei, Cichlidae). *Aquaculture Research*, 35, 358-364.
- Smith, R.S., 1971. A method for measuring digestibility and metabolizable energy of feeds. *Progressive Fish-Culture* 33. 132-134.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J., 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd ed. W.H. Freeman, New York, 887 p.
- Spyridakis, P., Metailler, R., Gabaudan, J., Riaza, A., 1989. Studies on nutrient digestibility in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) 1. Methodological aspects concerning faeces collection. *Aquaculture* 77, 61-70.

- Tacon, A. G.J.. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-ITALIA, GCP/RLA/102/ITA Proyecto Aquila II, Documento de Campo N° 4, 592 pp.
- Tacon, A. G. J. and A. M. P. Rodrigues. 1984. Comparison of chromic oxide, crude fibre, polyethylene and acid-insoluble ash as dietary markers for the estimation of apparent digestibility coefficients in rainbow trout. *Aquaculture* 43:391–399.
- Titgemeyer, E.C., Armendariz, D.J. Bindel, R.H. Greenwood, Loest C.A. 2001. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*. 79,1059-1063.
- Tonheim, S.K. Nordgreen, A., Høgøy, I., Hamre, K., Rønnestad, I., 2007. *In vitro* digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. *Aquaculture* 262, 426-435.
- True, C.D., 2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Doctorado en Ciencias en Oceanografía Costera, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, BC.
- Valenzuela-Quiñonez, F., García-de León, F.J., de Anda-Montañez, J.A., Balart, E.F., 2011. La totoaba del Golfo de California ¿Una especie en peligro de extinción? *Interciencia* 36, 664-671.
- Van Krimpen, MN.M., Veldkamp, T., Binnendijk, G.P., de Veer, G.P., 2010. Effect of four processed animal proteins in the diet on digestibility and performance in laying hens. *Poult. Sci.* 89, 2608–2616.
- Vandenberg, G.W., De La Noue, J., 2001. Apparent digestibility comparison in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) assessed using three methods of faeces collection and three digestibility markers. *Aquaculture Nutrition* 7, 237-245.
- Weatherup, R.N., McCracken, K.J., 1998. Comparison of estimates of digestibility of two diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), using two markers and two methods of faeces collection. *Aquaculture Research* 29, 527-533.
- Wetherbee. B. M., and S.H. Gruber. 1993 Absorption efficiency of the lemon shark *Negaprion brevirostris*. *The progressive Fish-Culturist* 55, 270-274.

- Windell, J.T., Foltz, J. W., Sarokan, J.A., 1978. Methods of fecal collection and nutrient leaching in digestibility studies. *Progressive Fish Culturist* 49, 51-55.
- Yin, Y.-L., McEvoy, J.D.G., Schulze, H., Hennig, U., Souffrant, W.-B., McCrackena, K.J., 2000. Apparent digestibility (ileal and overall) of nutrients as evaluated with PVTC-cannulated or ileo-rectal anastomised pigs fed diets containing two indigestible markers. *Livestock Prod. Sci.* 62, 133–141.
- Yutse, P., Longstaff, M.A., McNab, J.M., McCorquodale, C., 1991. The digestibility of semipurified starches from wheat, cassava, pea bean and potato by adult cockerels and young chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 35, 289-300.