

01682 2
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO DE LOS β -CAROTENOS EN BOVINOS PARA PREVENIR LA PIGMENTACION DE LA GRASA

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Presenta

MA. OFELIA MORA IZAGUIRRE

Bajo la dirección del:

DR. ARMANDO SHIMADA MIYASAKA

Cd. Universitaria, 1998



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

265717



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Es cierto que
los resultados de la ciencia
no dignifican a los hombres
ni los enriquecen,
pero si lo hace
el trabajo intelectual,
tanto productivo
como receptivo,
que es el esfuerzo por
comprender*

Albert Einstein

RESUMEN

Ma. Ofelia Mora Izaguirre. 1998. Estudios sobre el metabolismo de los β -carotenos en bovinos para prevenir la pigmentación de la grasa. Tesis de Doctorado. Asesor Ph. D. Armando Shimada Miyasaka.

La pigmentación amarilla de la grasa representa un problema de comercialización en el ganado bovino finalizado en pastoreo. Está bien documentado que dicha coloración es debida al depósito de β -caroteno en el tejido adiposo. A diferencia de otros ruminantes, los bovinos absorben cantidades significativas de dicho compuesto de la dieta y además no todo el absorbido es convertido a vitamina A. Con el objeto de conocer el metabolismo de dicho compuesto y determinar posibles diferencias entre ruminantes, se realizaron 3 experimentos. En el experimento 1 se determinó la tasa de desaparición de β -caroteno, luteína, carotenos totales y xantofilas totales de alfalfa (*Medicago sativa*) a nivel ruminal, se emplearon los métodos de digestibilidad *in vitro* e *in situ*, usando para ello 2 especies ruminantes: novillos Brahman (grasa amarilla) y cabras Granadinas (grasa blanca). La concentración de los compuestos carotenoides fue determinada por espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución. La tendencia de la desaparición *in vitro* fue lineal para todos los compuestos ($P < 0.01$). La tasa de desaparición (kd) de β -caroteno fue 0.13 y 0.37; luteína 0.2 y 0.25; carotenos totales 0.2 and 0.62 y xantofilas totales 0.3 y 0.77 h^{-1} para novillos y cabras, respectivamente. La tendencia de desaparición *in situ* fue cuadrática ($P < 0.01$). La kd de la MS fue 1.9 y 1.5% h^{-1} ; contenido celular 2.0 y 2.3; β -caroteno, 2.5 y 1.2; luteína, 2.5 y 1.5; carotenos totales, 2.2 y 1.0 y xantofilas totales, 2.1 y 1.1 % h^{-1} para novillos y cabras, respectivamente.

En el experimento 2 se determinó el efecto de diferentes dosis de β -caroteno en el alimento, sobre su concentración y la de retinol en el suero, fluidos digestivos, heces y algunos tejidos. Se usaron 8 novillos en 4 tratamientos durante 2 períodos de 79 días (d) cada uno. Los animales fueron alimentados los primeros 49 d de cada período con una dieta libre de β -caroteno y los siguientes 30 d fueron suplementados con β -caroteno en dosis de 0, 5.5, 44 o 352 mg/kg MS. Todos los animales fueron sacrificados al final del segundo período. Las concentraciones de β -caroteno fueron: 0, 0, 227.2 y 2010.95 $\mu g/dl$ ($P < .05$) en el líquido ruminal; 0, 0, 533.69 y 4417.97 $\mu g/dl$ ($P < .05$) en el líquido duodenal; 0, 4.03, 14.91 y 90.64 $\mu g/g$ ($P < .05$) en las heces (secas); 0.812, 1.186, 4.737 y 8.145 $\mu g/g$ ($P < .05$) en el hígado; 0.072, 0.148, 0.50 y 3.695 $\mu g/g$ ($P < .05$) en la grasa subcutánea; 0, 0, 0.091 y 0.232 $\mu g/g$ ($P < .05$) en la grasa perirrenal, para los tratamientos 0, 5.5, 44 y 352, respectivamente. El contenido de retinol en el hígado fue afectado por la dosis de β -caroteno: 101.12, 113.61, 161.7 y 199.61 ($P < .05$); no se encontraron diferencias en el contenido de retinol en la grasa subcutánea o perirrenal ($P > 0.1$).

En el experimento 3 se usaron 12 vaquillas Angus (grasa amarilla) y 14 cabras (grasa blanca) para evaluar el efecto de β -caroteno en la dieta sobre su absorción, la

actividad de la enzima 15,15'dioxigenasa y el contenido de β -caroteno y retinol en algunos tejidos. El experimento tuvo una duración de 120 d, durante los primeros 90 d los animales fueron alimentados con una dieta prácticamente libre de β -caroteno. Los siguientes 30 días fueron distribuidos completamente al azar en algunos de los tratamientos: 0, 5.5 o 352 mg de β -caroteno/kg de MS. Todos los animales fueron sacrificados al final del experimento. Los niveles de β -caroteno en la dieta no afectaron la tasa de crecimiento ($P>0.1$). En los bovinos no se encontró una interacción entre los tratamientos y las secciones de intestino delgado ($P>0.1$). Para el efecto de tratamiento, la actividad de la dioxigenasa fue: 0.192, .322 y .446 nmol retinal/mg proteína S-9/h ($P<0.01$) para los niveles 0, 5.5 y 352 mg β -caroteno, respectivamente; para las secciones del intestino delgado los resultados obtenidos fueron 0.446, 0.431 y 0.083 ($P<0.01$) nmol retinal/mg proteína S-9/h para duodeno, yeyuno e ileon, respectivamente. En el caso de los caprinos se observó una interacción entre tratamiento y sección intestinal ($P<0.05$); los resultados fueron para el tratamiento 0: 1.4, 1.404 y 0; para el tratamiento 5.5: 1.406, 1.423 y 0.128; y para el tratamiento 352: 1.464, 1.994 y 0.481 nmol retinal/mg proteína S-9/h para duodeno, yeyuno e ileon, respectivamente.

Con base en los resultados obtenidos las mayores tasas de desaparición de los carotenoides observadas en el método *in situ* contra la virtual ausencia de desaparición *in vitro* en ambas especies puede ser atribuida a la tasa de desaparición de la MS y del contenido celular. Estos resultados sugieren que los carotenoides desaparecen probablemente unidos al contenido celular y no por destrucción directa o por ataque de los microorganismos ruminales y que la desaparición ruminal es independiente de la especie estudiada. Por otra parte se observó que β -caroteno se absorbe en la misma proporción, independientemente de la dosis consumida y de los días de suplementación. Los resultados obtenidos muestran diferencias entre la actividad de la 15,15' dioxigenasa entre especies rumiantes, lo que explica en gran medida las diferencias en la pigmentación del tejido adiposo.

DEDICATORIA

Con todo mi amor a Juan Manuel

A quienes siempre llevo el pensamiento: mi papá y mis hermanos

Con todo cariño al maestro y amigo Dr. Armando Shimada

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) por que gracias a su infraestructura he podido realizar éstos estudios, pero sobre todo a su personal quienes ha sido mi ejemplo, mi apoyo y mis amigos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado para la realización de los estudios de doctorado y porque éste proyecto se está realizando gracias a su financiamiento (Proyecto L0062-B9607)

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme una vez más la oportunidad de ser un individuo de una clase privilegiada. A la FMVZ por el apoyo económico otorgado (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación 1995). A la FES-C por el apoyo de su personal administrativo, especialmente de la Sra. Rocío Reyes, y por permitirme usar la Unidad de Carnes, a Miguel y Pamela muchas gracias!

A la Universidad Autónoma de Querétaro por su apoyo en infraestructura y en personal, especialmente al Laboratorio de Toxicología del DIPA, en donde siempre me han hecho sentir como en casa. Muchas gracias Dra. Elvira, Dra. Chacha y M. C. Rosalía por su colaboración. Al Dr. Carlos Regalado, gracias!

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro, por el apoyo económico otorgado.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Armando Shimada Miyasaka

Dr. José Luis Romano Muñoz

Dr. Felipe Ruiz López

Dra. Elvira González de Mejía

Dr. Rogelio Gómez Alarcón

M.Sc. Ernesto Avila González

Dra. Silvia Buntinx Dios

gracias a cada uno por sus valiosas aportaciones y decidido apoyo

Especialmente al Dr. José Luis Romano de quien siempre he recibido un gran apoyo. Gracias por su tiempo, su actitud equilibrada y sus consejos, pero sobre todo gracias por su amistad

Al Dr. José Antonio Cuarón por su apoyo, consejos, críticas y regaños

Al Dr. Juan de Dios Garza, por haberme dedicado parte de su tiempo y por haber

realizado las cirugías para colocar las cánulas ruminales y duodenales

A BASF Mexicana S.A de C.V por la donación del β -caroteno. Todo mi agradecimiento al M.V.Z. Alejandro Medina

A mis amigos: América, Aracely, Toño, Emigdio, Ricardo, Juan Antonio, Roberto, Ericka, César, Ma. de los Angeles y Paulina, por aceptarme (espero) como soy y hacer mejores mis momentos de histeria

A Tercia y Gerardo Mariscal, porque siempre me levantan el ánimo

Una investigación de doctorado no es posible sin el apoyo de muchísimas personas no solo de una sino de varias instituciones, a todas y cada una de estas personas que me sería imposible nombrar, muchas gracias!

A los animales que se usan en investigación.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	X
INDICE DE ANEXOS	Xii
I. ANTECEDENTES	1
II. REVISION DE LITERARURA	2
Carotenoides	2
Nomenclatura y estructura de los carotenoides	2
Carotenoides hidrocarbonados	4
<i>Carotenoides oxigenados</i>	5
Retinoides	8
Características físicas de los carotenoides	10
Espectro de absorción	11
Biosíntesis de los carotenoides	13
Conversión de los carotenoides a vitamina A	13
Conversión enzimática (central)	15
<i>Desaparición ruminal, absorción y utilización</i>	18
Desaparición ruminal	18
Absorción y utilización	19
Distribución en sangre y tejidos	21
Almacenamiento en hígado	24
Actividad biológica	24
Tejido adiposo	26
III. Hipótesis	28
IV. Objetivo general	28

Objetivos específicos	28
V. <i>In vitro</i> and <i>in situ</i> disappearance of β -carotene and lutein from lucerne (<i>Medicago sativa</i>) hay, in bovine and caprine ruminal fluids	29
Abstract	29
Introduction	30
Materials and Methods	32
Results and Discussion	35
References	36
VI. Presence of fed β -carotene in digesta and tissues of Holstein steers	43
Abstract	43
Introduction	45
Materials and Methods	45
Results and Discussion	50
Literature cited	54
VII. Intestinal absorption of β -carotene and cleavage activity of 15,15' dioxygenase in cattle and goats	70
Abstract	70
Introduction	71
Materials and Methods	72
Results	76
Discussion	78
Literature cited	80
VIII. Discussion general	92
IX. Conclusiones	97
X. Literatura citada	99

Indice de Cuadros

Cuadro	Página
Cuadro 1. Grupo terminal usado para designar a los carotenos	4
Cuadro 2. Actividad biológica de la vitamina A en compuestos que se encuentran en los alimentos	10
Cuadro 3. Solubilidad y absorbancia de luteína y β -caroteno	11
Cuadro 4. Efecto de la adición de β -caroteno a la dieta de hurones y ratas sobre su concentración en suero, hígado y tejido adiposo	21
Cuadro 5. Factores genéticos asociados al color de la grasa	23
Cuadro 6. Acciones biológicas de los carotenoides	25
Table 1. Chemical composition of lucerne hay in dry matter basis	39
Table 2. Mean observed disappearance percentages of β -carotene, lutein, total carotene and total xanthophyll in steers (S) and goats (G) ruminal fluid by in vitro method	40
Table 3. Disappearance percentages of β -carotene, lutein, total carotene and total xanthophyll in steers (S) and goats (G) ruminal fluid by in situ method	41
Table 4. Disappearance rates of β -carotene, lutein, total carotene and total xanthophyll, dry matter and cellular content in steers (S) and goats (G) ruminal fluid by in vitro and in situ method	42
Table 1. Composition of experimental diet	56
Table 2. Effect of level of β -carotene fed to Holstein steers on its concentration in rumen liquor, duodenal fluid and faeces	57
Table 3. Effect of level of β -carotene fed to Holstein steers on its concentration in tissues, $\mu\text{g/g}$	58
Table 4. Effect of level of β -carotene fed to Holstein steers on the retinol concentration in tissues, $\mu\text{g/g}$	59
Table 1. Composition of the basal diets	83

Table 2. Plasma β -carotene and retinol in heifers and goats fed different levels of β -carotene for 30 days	84
Table 3. β -carotene and retinol concentration of dry feces on heifers and goats fed different levels of β -carotene for 30 days	85
Table 4. Effect of β -carotene fed to heifers on β -carotene and retinol concentrations in tissues, nmol/g	86
Table 5. Effect of β -carotene fed to goats on β -carotene and retinol concentrations in tissues, nmol/g	87
Table 6. Effect of fed β -carotene on cleavage activity of 15,15'-dioxygenase in the liver of heifers and goats, nmol retinal.h ⁻¹ .mg protein S-9 ⁻¹	88

Indice de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Estructura química del polienlicopeno	3
Figura 2. Estructura química de α y β -caroteno	5
Figura 3. Estructura química de los principales oxicarotenoides	7
Figura 4. Estructura básica de los retinoides	9
Figura 5. Espectro de absorción ultravioleta y visible de β -caroteno, γ -caroteno y licopeno en hexano	12
Figura 6. Formación biosintética de los carotenoides	14
Figura 7. Conversión de β -caroteno a retinol	16
Figure 1. Serum concentrations of β -carotene and retinol during washout periods	60
Figure 2. Effect of fed β -carotene on its concentration in serum	61
Figure 3. Effect of fed β -carotene on the concentration of retinol in serum	62
Figure 4. Effect of level of fed β -carotene on its concentration in ruminal liquor during 10, 20 and 30 days	63
Figure 5. Effect of level of fed β -carotene on its concentration in duodenal fluid during 10, 20 and 30 days	64
Figure 6. Effect of level of fed β -carotene on its concentration in faeces liquor during 10, 20 and 30 days	65
Figure 7. Behaviour of β -carotene concentration in the liver and adipose tissue	66
Figure 8. Behaviour of retinol concentration in the liver	67
Figure 9. Concentration of marker (Yb) in faeces after administration	68
Figure 10. Concentration of marker fluid (Co) after administration, to calculate the dilution rate	69

Figure 1. Effect of fed β -carotene on cleavage activity in the intestine of Angus Heifers	89
Figure 2. Effect of small intestine section on β -carotene cleavage activity in Angus heifers	90
Figure 3. β -carotene cleavage activity in the intestine of goats	91

Índice de Anexos

Anexo	Página
Anexo 1. Gráficas complementarias al Estudio " <i>In vitro and in situ</i> disappearance of β -carotene and lutein from lucerne (<i>Medicago sativa</i>) hay, in bovine and caprine ruminal fluids"	104
Anexo 2. Gráficas complementarias al Estudio "Intestinal absorption of β -carotene and cleavage activity of 15,15' dioxygenase in cattle and goats"	106
Anexo 3. ANDEVA para Etapa 1	114
Anexo 4. ANDEVA para Etapa 2	118
Anexo 5. ANDEVA para Etapa 3	121
Anexo 6. Procedimiento para marcar la fibra con yterbio por el Método de inmersión-lavado	127
Anexo 7. Procedimiento para la determinación de yterbio y cromo	128
Anexo 8. Programa SAS para modelos de dos compartimientos, Edad-dependiente, edad-independiente	130

I. ANTECEDENTES

Se ha observado que el tejido adiposo de los bovinos para abasto engordados en condiciones de pastoreo puede presentar coloración amarillenta debido a la deposición de los carotenos y/o carotenoides provenientes de su ingesta. A pesar de que la coloración de la grasa no afecta el sabor ni el valor alimenticio de las porciones comestibles, la presencia de los pigmentos representa un problema económico serio, por el rechazo del producto por parte de consumidor, tanto nacional como extranjero.

El productor ha tratado de superar el problema mediante el confinamiento de sus animales durante algunos meses previos al sacrificio, lo que no solo no garantiza la efectividad de la despigmentación, sino que resulta en un incremento innecesario en los costos de producción y, en última instancia, en la economía del consumidor final.

A pesar de la magnitud del problema, se ha encontrado escasa información sobre las causas o las soluciones al mismo. Con el presente trabajo se propone conocer el metabolismo de β -caroteno a nivel del tubo digestivo y tisular en bovinos (grasa amarilla) y caprinos (grasa blanca) como punto de partida para entender el depósito de β -caroteno y su diferencia con otros rumiantes.

II. REVISION DE LITERATURA

Carotenoides

En los vegetales se han identificado un gran número de terpenos, entre los que se encuentran a los carotenoides, que son una clase de hidrocarburos tetraterpénicos, así como sus derivados oxigenados. Existen dos clases principales de pigmentos carotenoides en los cloroplastos: los carotenos, que son hidrocarburos isoprenoides y no contienen oxígeno, y las xantofilas, que son semejantes en su estructura pero contienen oxígeno en sus anillos terminales (Lehninger 1984). Solo las plantas sintetizan carotenoides; los animales carecen de esta habilidad y únicamente pueden modificar un poco la estructura de los carotenoides ingeridos (Tee 1992; Serrano 1993).

Nomenclatura y estructura de los carotenoides

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC-IUB 1975) el término *carotenoide* se aplica a un gran número de compuestos liposolubles que colorean de amarillo a rojo. Esta característica cromófora se debe a la presencia de una serie de dobles enlaces conjugados. Esta gran familia de pigmentos se ha agrupado como hidrocarbonados (licopeno y α , β y γ carotenos) y los derivados oxigenados (oxicarotenoides o xantofilas) (Gross 1991; Tee 1992).

La estructura básica de los carotenoides consiste de 5 a 8 unidades isoprenoides, unidas de manera normal de cabeza a cola, excepto en el centro de la molécula, donde el orden es inverso al esqueleto de C_{40} . Los dos grupos metilo centrales están en las posiciones 1,6; los restantes grupos metilo no terminales están en posiciones 1,5 (Tee 1992).

En la Figura 1 se observa el polienlicopeno acíclico conjugado $C_{40}H_{56}$, que es una estructura lineal, a partir del cual se van a formar los carotenoides. Los cambios en la estructura de esta molécula que van a determinar la formación de

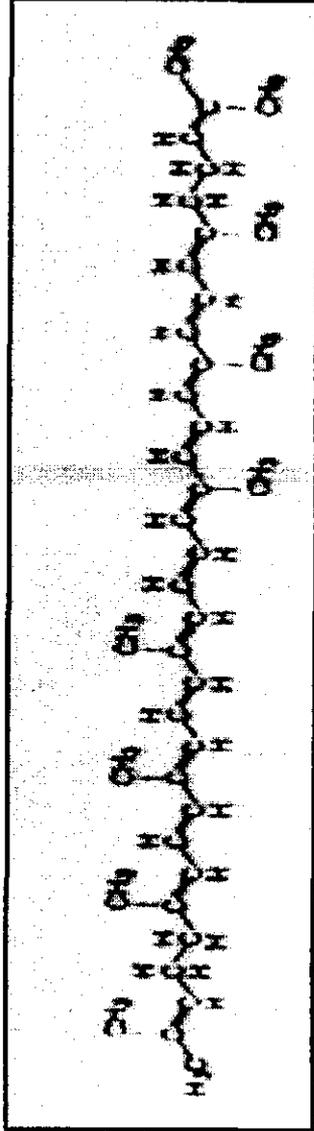


Figura 1. Estructura química del polienlicopeno

carotenoides involucran las siguientes reacciones:

- 1) hidrogenación
- 2) deshidrogenación
- 3) ciclización
- 4) inserción de oxígeno en varias formas
- 5) migración de dobles enlaces
- 6) migración de grupos metilo
- 7) *elongación de la cadena* y
- 8) *acortamiento de la cadena*

El número de carotenoides hidrocarbonados es pequeño; la mayoría son carotenoides oxigenados (Tee 1992).

Carotenoides hidrocarbonados

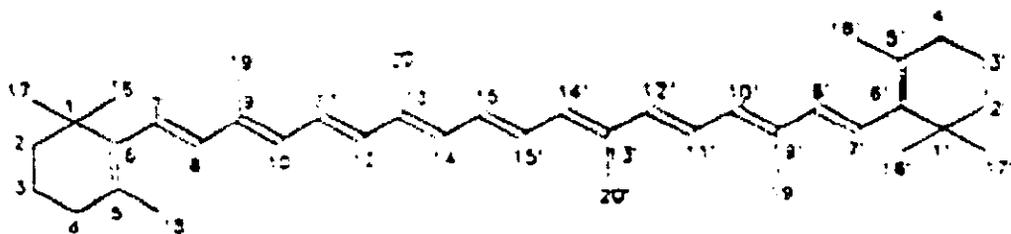
Los carotenoides hidrocarbonados se conocen como carotenos. Los nombres específicos de los compuestos de este grupo se basan en el nombre principal caroteno. El nombre sistemático de un carotenoide hidrocarbonado se contruye añadiendo dos letras griegas como prefijo a la palabra caroteno, dependiendo de los dos grupos terminales que en C_9 tenga la cadena (Cuadro 1). Los cambios en los niveles de hidrogenación están indicados por el prefijo hidro o deshidro al nombre básico (Gross 1991; Tee 1992).

En la Figura 2 se observan los principales carotenoides hidrocarbonados.

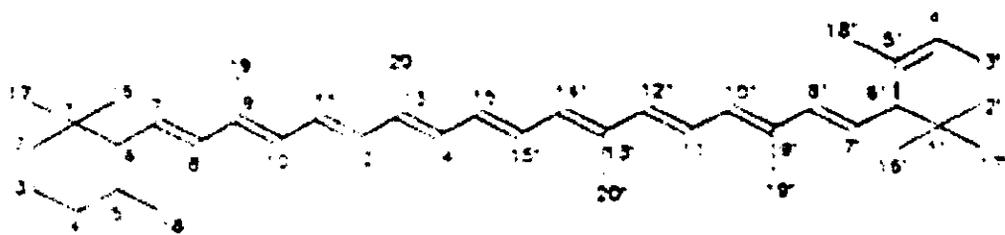
Cuadro 1. Grupo terminal usado para designar a los carotenos.

Tipo	Prefijo	Fórmula	Estructura
Acíclico	ψ (psi)	C_9H_{15}	V
Ciclohexano	β, ϵ (beta, epsilon)	C_9H_{15}	VI, VII
Metileno-ciclohexano	γ (gamma)	C_9H_{15}	VIII
Ciclopentano	κ (kappa)	C_9H_{17}	IX
Aril	ϕ, χ (phi, chi)	C_9H_{11}	X, XI

(Tee 1992)



β -Carotene (B, β -carotene) (C₄₀H₅₆):



α -Carotene (B, α -carotene) (C₄₀H₅₆):

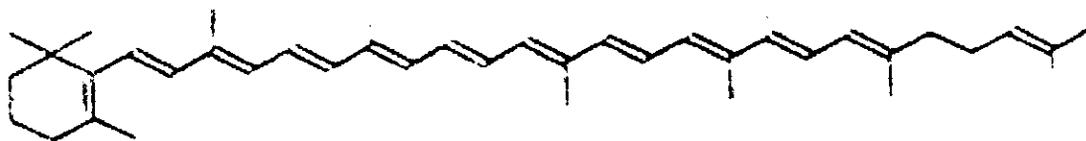


Figura 2. Estructura química de α y β -caroteno

Carotenoides oxigenados

Son conocidos como xantofilas. Ejemplos de algunos de estos compuestos son:

- 1) hidroxilo, e.g. zeaxantina
- 2) metoxilo, e.g. espiriloxantina
- 3) glicosiloxilo, e.g. mixoxantofila
- 4) carboxilo, e.g. torularodina
- 5) oxo, e.g. equinenona
- 6) aldehído, e.g. aldehído de torularodina
- 7) epoxilo, e.g. anteraxantina

(Gross 1991; Tee 1992)

En la Figura 3 se observan algunos de los principales carotenoides oxigenados.

Retrocarotenoides

Son aquéllos en los cuales el enlace doble o sencillo del polieno conjugado está en la posición uno, e.g., 3-Hidroxi-6',7' retro- β,ϵ -caroteno-3'-1.

Secocarotenoides

Son carotenoides en los cuales se presenta la fusión del enlace entre dos átomos de carbono adyacentes (diferentes al carbono 1 y 6) de un grupo cíclico terminal, manteniéndose el esqueleto de C_{40} , e.g., 2,3 Seco- ϵ,ϵ -caroteno.

Apocarotenoides

Son carotenoides en los que el esqueleto de carbono ha sido acortado por la remoción o fragmentación de uno o ambos extremos, e.g., 2'Apo- β,ψ -caroteno-2'al.

Norcarotenoides

Los átomos de carbono han sido removidos del carotenoide por un proceso diferente a la fragmentación de los dobles enlaces carbono-carbono, e.g., 2,2'-Dinor- β,β -caroteno.

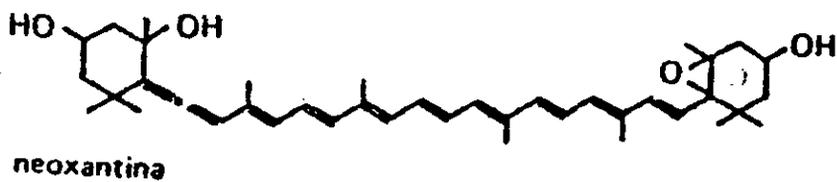
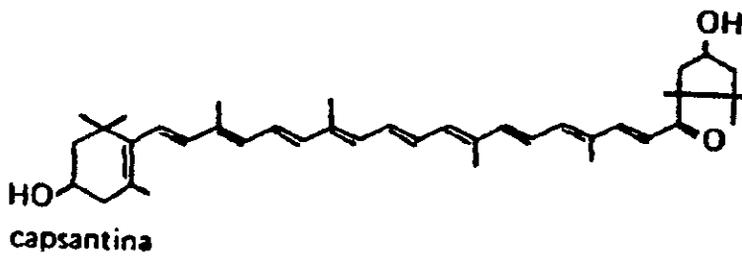
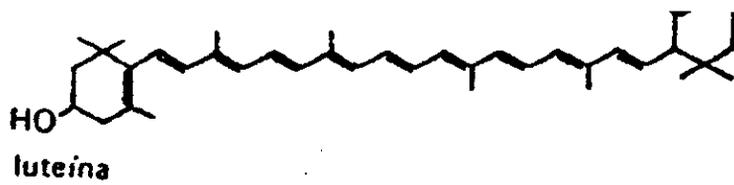
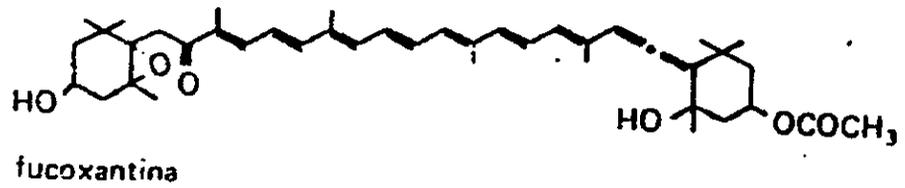


Figura 3. Estructura química de algunos carotenoides oxigenados

Carotenoides pesados

Hasta hace poco no se conocían carotenoides cuyo esqueleto tuviera más de 40 átomos de carbono. En los últimos años sin embargo, se han descubierto pigmentos de bacterias no fotosintéticas que poseen estructuras de 45 a 50 carbonos. Esta clase de compuestos hidrocarbonados y sus derivados oxigenados poseen más de 8 unidades isoprenoides de manera similar a los compuestos C₄₀. Para nombrarlos se utilizan los prefijos mono o di más el nombre del carotenoides C₄₀ (Tee 1992).

Retinoides

Los *retinoides* son compuestos formados por 4 unidades isoprenoides. Todos los retinoides son derivados de un compuesto monocíclico, que contiene 5 dobles enlaces carbono-carbono y un grupo funcional al final de la porción acíclica (Figura 4). En años recientes el término retinoide se aplica a los compuestos naturales con actividad de vitamina A y a sus análogos sintéticos, con o sin actividad biológica de retinol. Los carotenoides no están incluidos en este grupo de compuestos (Gross 1991; Tee 1992).

Los tres retinoides que se encuentran en la naturaleza son: (Gross 1991; Tee 1992).

- 1) retinol, también conocido como vitamina A, axeroftol o axerol.
- 2) retinaldehído, conocido como retinal.
- 3) ácido retinoico.

En el Cuadro 2 se observa la actividad de diversos compuestos tanto retinoides como carotenoides .

Debido a la importancia de los carotenoides (principalmente β-caroteno) como fuente de vitamina A, se han hecho gran cantidad de investigaciones para evaluar el potencial de conversión cada uno. La Organización Mundial de la Salud (WHO 1976) señala que 1 μg de β-caroteno es equivalente a 0.167 μg de retinol o 0.56

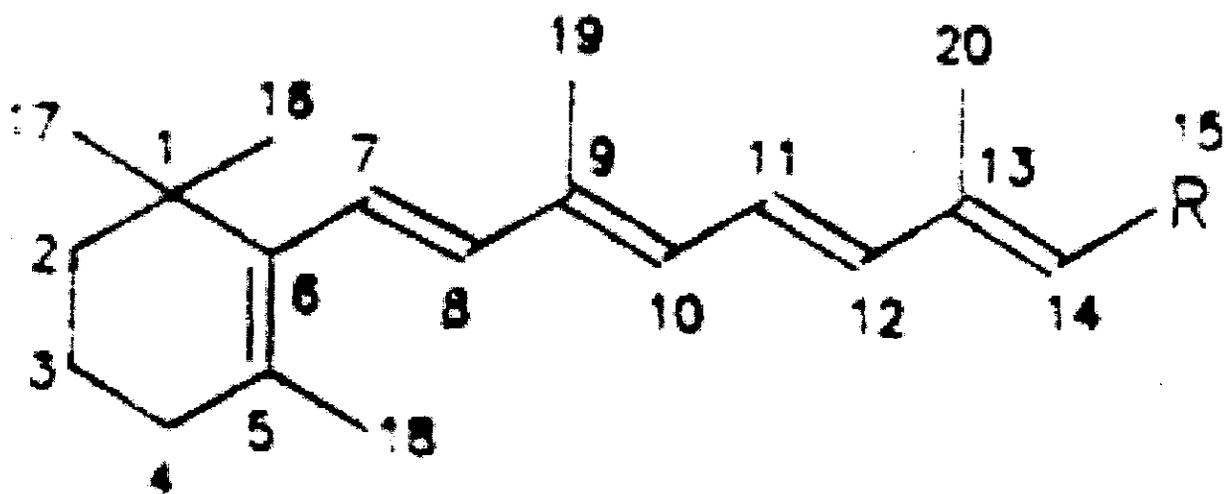


Figura 4. Estructura básica de los retinoides

UI de vitamina A. En los bovinos se reporta (NRC 1996) que 2.5 μg de β -caroteno son igual a 1 UI de vitamina A.

Cuadro 2. Actividad biológica de vitamina A en compuestos que se encuentran en los alimentos.

Compuesto	Actividad biológica (% de todo-trans- retinol)
Todo-trans retinol	100
13-cis retinol	75
Retinaldehído	90
Dehidro-retinal	40
β -caroteno	16.7
α -caroteno	8.35
γ -caroteno	8.35
β -criptoxantina	8.35
β -caroteno 5,6 epóxido	8.35

(Marks 1993)

Características físicas de los carotenoides

Son cristales de gran variedad de formas, que van de un color rojo a violeta, pudiendo ser incluso negros. Sus puntos de fusión son altos y tienden a incrementarse conforme se incrementa el peso molecular y los grupos funcionales (Gross 1991; Tee 1992). El sistema de los dobles enlaces conjugados los hace muy sensibles a la descomposición oxidativa cuando se exponen al aire (Schmitz *et al.* 1993).

Los carotenoides son insolubles en agua, ligeramente solubles en aceites vegetales, moderadamente solubles en compuestos alifáticos y aromáticos y muy solubles en compuestos clorinados hidrocarbonados (e.g., cloroformo) (Tee 1992).

En el Cuadro 3, se muestra la solubilidad de luteína y β -caroteno en algunos solventes orgánicos.

Cuadro 3. Solubilidad y absorbancia relativa de luteína y β -caroteno

Solvente	LUTEINA			β -CAROTENO		
	solubilidad mg/L	λ_{max} , nm	absorbancia $E^{1\%,cm^{-1}}$	solubilidad mg/L	λ_{max} , nm	absorbancia $E^{1\%,cm^{-1}}$
Acetona	800	446	2540	200	452	2559
Acetonitrilo	100	446	2559	10	452	2540
Benceno	600	456	2350	4000	462	2304
Cloroformo	6000	454	2369	2000	462	2330
Diclorometano	800	800	2320	6000	460	2369
Dimetilsulfóxido	1000	460	2369	30	466	2259
Etanol	300	300	2550	30	450	2529
Hexano	20	444	2589	600	448	2592
Metanol	200	442	2629	10	450	2540
Tetrahidrofurano	8000	450	2469	10000	456	2399
Tolueno	500	456	2290	4000	462	2270

(adaptado de Craft 1992)

Espectro de absorción

Las características de espectro de absorción de los carotenoides se determinan por el número de dobles enlaces y algunas características estructurales (tales como isómeros sustituyentes cis o trans) y el solvente en el cual se encuentren solubilizados.

Se ha observado que cuando aumentan en la cadena el número de dobles enlaces se incrementa la variación máxima de absorción de 7 a 35 nm (Gross 1991; Tee 1992). La Figura 5 muestra el espectro de absorción de β -caroteno, gama caroteno y licopeno en hexano.

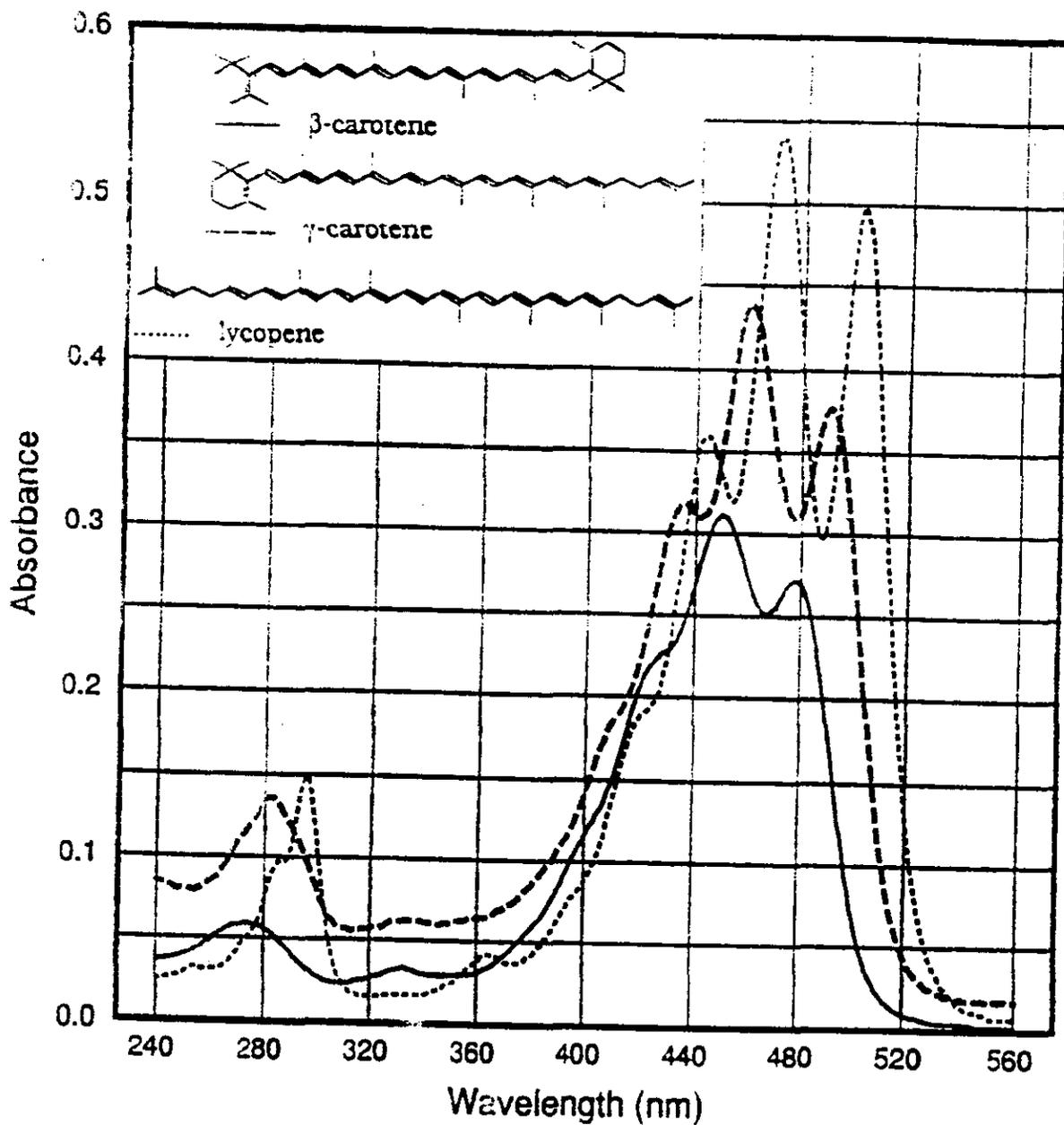


Figura 5. Espectro de absorción de β -caroteno, γ -caroteno y licopeno en hexano

El solvente en el cual es medido el espectro de absorción muestra un marcado efecto sobre la posición máxima y la absorbancia molecular del compuesto.

Biosíntesis de carotenoides

Los carotenoides de 30, 45 y 50 carbonos son producidos por bacterias no fotosintéticas; la mayoría de los carotenoides naturales, en particular los que están presentes en las plantas superiores, son tetraterpenos (C₄₀). La estructura básica de estos compuestos es la repetición de unidades isoprenoides (Gross 1991; Tee 1992).

Tal como se muestra en la Figura 6 la acetil CoA es básica para la síntesis de carotenoides, tres moléculas de la cual resultan en la formación de 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A. Este es convertido a ácido mevalónico. La condensación de 2 moléculas de isopentenil pirofosfato (después de la isomerización de uno de ellos a dimetilalil pirofosfato) forma al geranil pirofosfato. La subsecuente adición de una unidad isoprena de C₅ (vía isopentenil pirofosfato) forma un compuesto intermediario de 15 carbonos y 20 carbonos.

En la biosíntesis de los carotenoides, dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato se condensan para formar el primer precursor común de los carotenoides, un compuesto hidrocarbonado de 40 carbonos llamado fitoeno. Este es convertido progresivamente a compuestos insaturados, hasta la formación del licopeno. El licopeno es convertido a compuestos monocíclicos alfa y beta carotenos, los cuales, mediante nuevas ciclizaciones, forman α y β caroteno (Olson 1989; Tee 1992). La introducción de oxígeno en la molécula resulta en la formación de xantofilas.

Conversión de los carotenoides a Vitamina A

Está claro que los carotenos pueden actuar como precursores de la vitamina A y su conversión a ésta se lleva a cabo en los animales (Figura 6). La conversión de β -caroteno a retinol es un proceso importante, ya que la mayoría de la vitamina A que utilizan los animales deriva de este proceso. Después de su

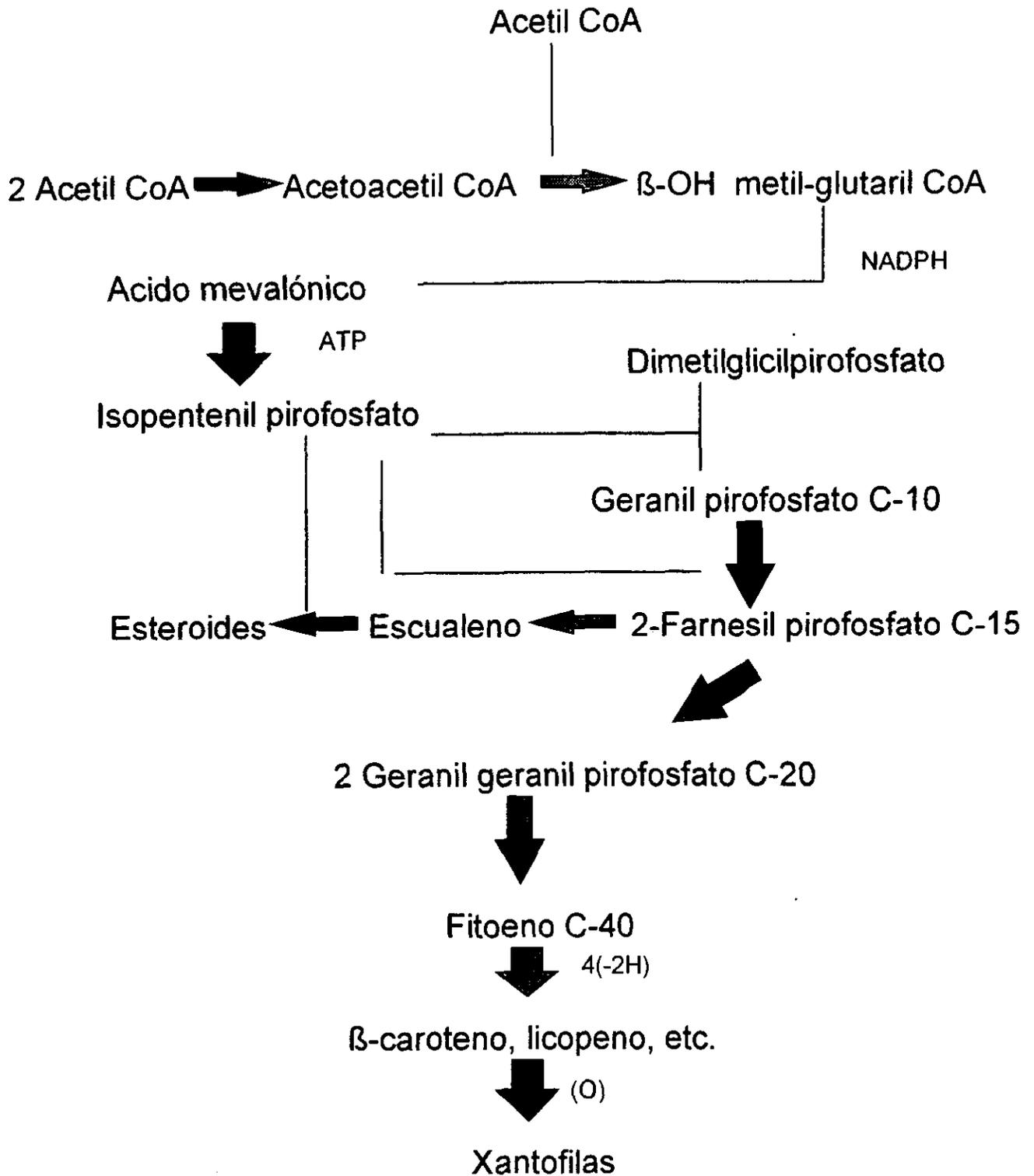


Figura 6. Formación biosintética de los carotenoides

absorción, el carotenoide es separado en las células de la mucosa intestinal para formar vitamina A (Tee 1992).

En 1960, Glover propuso 2 vías principales mediante las cuales los carotenos pueden ser convertidos en vitamina A; ambas son reacciones oxidativas:

1) Ruptura central, la cual ocurre en el doble enlace central (15,15'). El producto de este tipo de división son 2 moléculas de retinal.

2) Ruptura excéntrica, la cual puede ocurrir en uno o más de otros dobles enlaces. Sus productos pueden ser un β -apo-carotenal largo y uno corto, e.g., ciclocitral y β -apo-8'-carotenal, si es que la ruptura ocurriera en el doble enlace 8'.

Experimentalmente, está demostrado que los β -apocarotenales pueden ser convertidos a β -caroteno (Olson 1989).

Conversión enzimática (central)

La conversión de β caroteno en vitamina A fue demostrada por Moore en 1930, quien alimentó ratas deficientes en vitamina A con β -caroteno. A partir de este momento quedó establecido que el intestino es el sitio de mayor conversión. En la Figura 7 se observa la conversión de β -caroteno a retinol, tal como se lleva a cabo en el intestino delgado.

Goodman y Huang (1965) reportan la conversión activa de β -caroteno a retinal utilizando homogenizados de mucosa intestinal (libres de células). La separación enzimática de β caroteno en retinaldehído fue reportada por Goodman y Huang (1965) y por Olson y Hayaishi (1965).

Goodman *et al.* (1967) obtuvieron formas parcialmente purificadas de la enzima 15,15' dioxigenasa (EC 1. 13. 11. 21) de mucosa intestinal de rata, a partir de la precipitación con sales de amonio. Observaron que la enzima fue estimulada por la adición de tioles y fue fuertemente inhibida por sulfidrilos y agentes quelantes.

Subsecuentes estudios han mostrado que el oxígeno molecular reacciona con los dos carbonos centrales del β -caroteno, seguido por la separación del

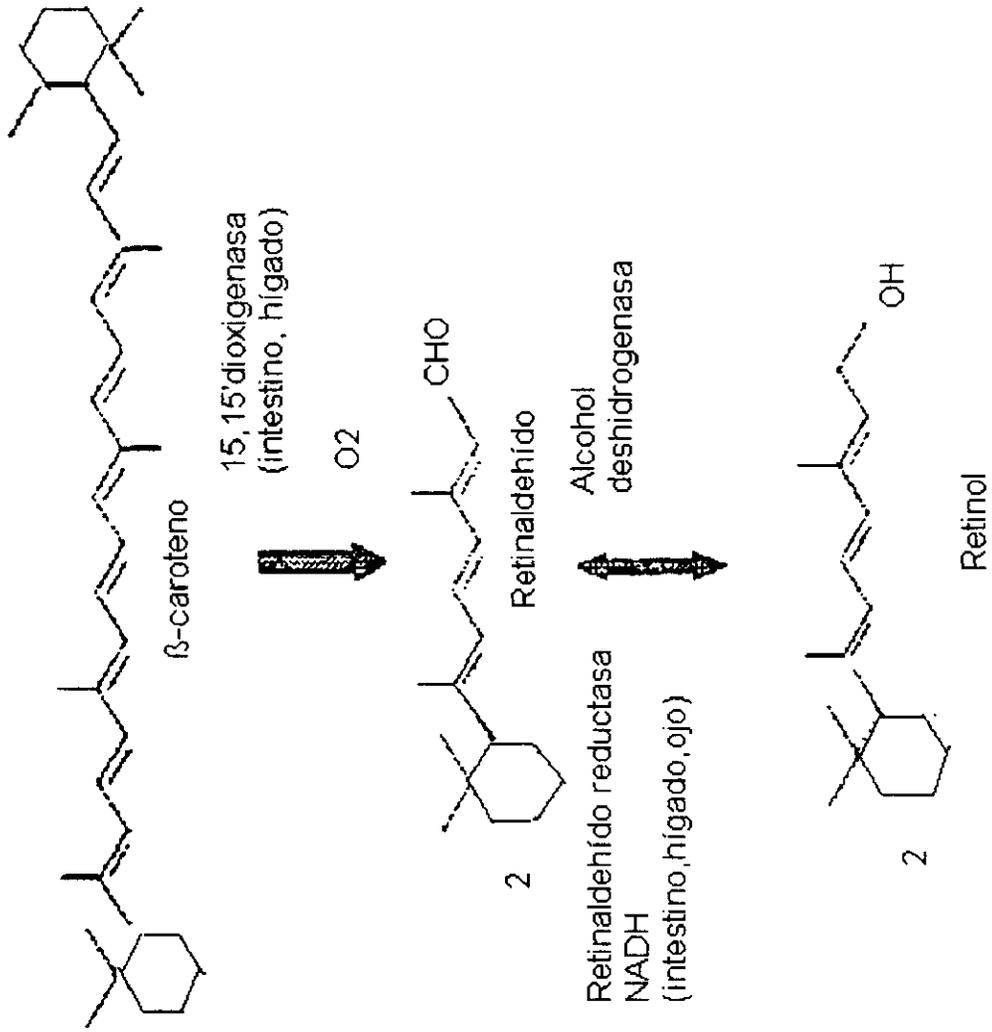


Figura 7. Conversión de β -caroteno a retinol

doble enlace central del caroteno para formar 2 moléculas de retinaldehído (Bendich y Olson 1989; Olson 1989).

Formas parcialmente purificadas de esta enzima se han obtenido en intestinos de ratas, cerdos, conejos, hurones y gerbos (Goodman y Huang 1965; Olson y Hayaishi 1965; Olson 1989; van Vliet *et al.* 1996; Lederman *et al.* 1998; Lee *et al.* 1998). Sin embargo, debido a su labilidad durante los procesos de purificación, la enzima pura no ha sido aislada todavía; razón por la cual estudios sobre la actividad de dicha enzima utilizan fracciones protéicas solubles de mucosa intestinal (obtenidas mediante centrifugaciones).

La enzima también ha sido parcialmente purificada de hígado (Bendich y Olson 1989; Olson 1989). No se encontraron reportes de su purificación o aislamiento a partir de intestinos o hígado de bovinos.

La conversión de β caroteno a retinal en el intestino de la rata se lleva a cabo a un pH óptimo de 7.5 a 8, con una V_{max} de 8 nmol de retinal formado por hora y una K_m de $3 \times 10^{-6} M$. En conejos, la V_{max} es aproximadamente de 1.4 nmol de retinal formado a partir de β caroteno/mg de proteína \cdot hora⁻¹, a una temperatura de 37 C (Olson 1989).

Por los valores hasta ahora obtenidos de esta enzima, se puede considerar, primero, que la enzima posiblemente no se satura totalmente; consecuentemente, la tasa fisiológica bajo condiciones normales es únicamente una fracción de la tasa máxima. En segundo lugar, los cálculos se refieren sólo a la actividad intestinal de la enzima, y el hígado también la contiene, por lo que la actividad máxima en el organismo es mayor a lo hasta ahora calculado. En tercer término, se deben considerar las observaciones de que la tasa máxima es menor que la cantidad requerida para producir toxicidad crónica, por lo que aún cuando se den altas dosis de β -caroteno, no se produce hipervitaminosis A (Olson 1989). La eficiencia de conversión de β caroteno a vitamina A en la mucosa intestinal varía con la especie (Tee 1992). A diferencia de los mamíferos, algunos peces y aves pueden formar vitamina A a partir de astaxantina, cantaxantina e

isozeaxantina (Bendich y Olson 1989). Los peces pueden convertir a la luteína en 3-hidro-retinol (Olson 1989).

Es importante hacer notar que una porción de los carotenos absorbidos no es metabolizada en la mucosa intestinal, sino que es incorporada a los quilomicrones y pasa a la sangre vía linfática como tal. Estos pueden ser depositados en el hígado o en otros lugares, tales como tejido adiposo u otros órganos (Bendich y Olson 1989).

Desaparición ruminal, absorción y utilización.

Desaparición ruminal

Existen relativamente pocas investigaciones acerca del metabolismo ruminal de los β carotenos y la vitamina A. Shorland *et al.* (1957) realizaron estudios *in vitro* con líquido ruminal de ovinos y señalan que los carotenos no son afectados por la fermentación ruminal.

Por otra parte, existen evidencias de pérdidas reticulo-ruminales de vitamina A y de carotenos. King *et al.* (1962) observaron destrucción de ambos cuando fueron incubados *in vitro* en líquido ruminal. La recuperación de β -caroteno en muestras que fueron adicionadas de estos compuestos, que no fueron incubadas, fue de 97.5%; sin embargo, en muestras que fueron incubadas por 9 horas el porcentaje de recuperación fue de 65.6%. Los antioxidantes (santoquina y tocoferol) pueden reducir las pérdidas en períodos de incubación de 10 horas.

Keating *et al.* (1964) utilizaron etoxiquina y nitrato de potasio para determinar la destrucción *in vitro* de acetato de vitamina A y β -caroteno. En la determinación de vitamina A no encontraron diferencias entre tratamientos (basal, +nitrato, +etoxiquina y +nitrato y etoxiquina) después de 4 horas de incubación; sin embargo, después de 16 horas de incubación los porcentajes de recuperación fueron de 39 para el basal, 87.6 para el que contenía nitrato, 87.6 para el que estaba adicionado con etoxiquina y 75 para el que contenía ambos. En el caso de

β -caroteno no se encontraron diferencias entre tratamientos ni a las 3.5 (83.4%) ni a las 16 horas de incubación (72.7%), aunque no se indica si hubo utilización.

Klatte (1964) observa que la vitamina A en el rumen es destruida debido a la acción de los microorganismos ruminales, por lo que un cambio en la población microbiana puede alterar la destrucción de vitamina A.

Van Soest (1994) señala que si bien los carotenoides pueden ser atacados por las bacterias anaeróbicas e hidrogenarse, el sistema de dobles enlaces conjugados de estos compuestos (posición trans), los hace más resistentes a la hidrogenación, comparados con compuestos insaturados no conjugados, lo que permite que prácticamente éstos lleguen intactos al intestino delgado.

La información hasta ahora encontrada es contradictoria, razón por la cual es importante conocer si los carotenoides son o no utilizados por los microorganismos ruminales.

Absorción y utilización

Después de la ingestión del alimento, los carotenoides son liberados por acción enzimática en el intestino delgado y junto con la vitamina A son disueltos en los glóbulos grasos que pasan a través del lumen del duodeno. Aquí, los glóbulos se encuentran con las sales biliares y las enzimas pancreáticas, las cuales liberan productos de la digestión lipídica. Los ésteres de vitamina A son hidrolizados en este momento. Estos productos de la digestión interactúan con las sales biliares y el colesterol y forman micelas mixtas, en las cuales se solubilizan la vitamina A y los carotenos. Estas micelas se difunden por la glicoproteína de la membrana de las células de la mucosa. Los componentes de la micela, excepto las sales biliares, penetran individualmente a la fase lipídica de la membrana de las células de la mucosa (Tee 1992).

La eficiencia de dispersión de la vitamina A y de los carotenos es afectada por la presencia o ausencia de otros componentes de la dieta, así como por el estado nutricional del individuo. Primero, las proteínas solubles y los péptidos

derivados de ellas ayudan a la dispersión de la vitamina. El incremento en el nivel de proteína en la dieta ayuda a la conversión intracelular del caroteno a retinaldehído (Tee 1992). Grownowska-Senger y Wolf (1970) reportan que la actividad de la enzima intestinal 15,15'-dioxigenasa se deprime en aproximadamente 50% con consumos de proteína muy bajos (5%). En segundo término, la grasa de la dieta provee el medio de transporte de la vitamina A y de los carotenoides del estómago al lumen intestinal. Además, algunos lípidos de la dieta como los aceites de semillas, que contienen α -tocoferol, tiene un efecto protector antioxidante sobre la vitamina A. En tercer lugar, para que se realice un eficiente absorción de la vitamina A y de los carotenoides es necesaria la presencia de las sales biliares (Tee 1992).

Los niños muestran una capacidad ineficiente de absorción de carotenos. La tasa de absorción se encuentra disminuida debido a que la solubilidad de β -caroteno y otros carotenoides en la grasa es limitada (WHO 1976). Sin embargo, en becerros Holstein recién nacidos, administrando una dosis oral de 20 mg de β -caroteno se observó un aumento en el suero entre las 12 y 30 horas post-dosificación, declinando después lentamente (Poor *et al.* 1992).

Los carotenos presentes en los alimentos son menos absorbidos en el intestino que los precursores preformados de la vitamina A, pero esto puede variar dependiendo de la especie animal de que se trate (Schiedt 1988).

Bajo condiciones normales, en humanos, cerca del 90% de la vitamina A ingerida es absorbida y la eficiencia de absorción disminuye muy poco al incrementar la dosis. Por otra parte, cerca del 70% de los β carotenos ingeridos son absorbidos y la eficiencia de absorción disminuye fuertemente al incrementar la dosis (Tee 1992).

Después de la absorción, los β -carotenos alojados en las células de la mucosa intestinal son convertidos a retinaldehído. Este es reducido a retinol. Durante su paso a través del epitelio intestinal, cerca del 75% del retinol es esterificado con ácidos grasos de cadena larga. Estos esteres, comunmente en

forma de palmitato o ácido esteárico, son incorporados junto con otros lípidos y junto con las apoproteínas, a los quilomicrones, los cuales pasan a la linfa.

Distribución en sangre y tejidos

Los carotenoides son constituyentes normales de la sangre y tejidos de los humanos, bovinos, equinos, hurones, gerbos, peces, aves y algunos crustáceos (Ribaya *et al.* 1989, 1992; White *et al.* 1993; Pollack *et al.* 1994). Esto debido probablemente, a que no todos los β -carotenos ingeridos son convertidos eficientemente a vitamina A y parte de ellos son absorbidos y depositados como tal.

Tal como se muestra en el Cuadro 4, no existe evidencia de que exista absorción y circulación de β -caroteno en ratas, cerdos, pollos, cuyes y conejos (Ribaya *et al.* 1989), debido a una conversión más eficiente de β -caroteno a vitamina A.

Cuadro 4. Efecto de la adición de β -caroteno a la dieta de hurones y ratas, sobre su concentración en suero, hígado y tejido adiposo.

Dieta (mg/kg PV)	Suero (μ g/dl)	Hígado (μ g/g)	Tejido adiposo (μ g/g)
Hurón			
0	0.6 ^a	0 ^a	0 ^a
4	15.3 ^b	0.9 ^b	0.1 ^b
20	41.5 ^c	4.1 ^c	0.2 ^c
Rata			
0	0	0	0
4	0.6	0	0
20	0.5	0	0

Adaptado de Ribaya *et al.* 1989 (^a, ^b y ^c P<0.01).

La cantidad total y las concentraciones específicas de cada carotenoide en la sangre y en los tejidos van a estar en función del consumo diario de estos pigmentos (Bendich y Olson 1989).

Los carotenoides son transportados en la sangre en asociación con lipoproteínas, principalmente con lipoproteínas de baja densidad (LBD) en humanos y cerdos (Bendich y Olson 1989; Tee 1992; Pollack *et al.* 1994). Sin embargo, en bovinos y cerdos están asociados a lipoproteínas de alta densidad (LAD) (Pollack *et al.* 1994).

En humanos bien alimentados, los carotenoides están presentes principalmente en el tejido adiposo (80-85%), en el hígado (8-12%) y en el músculo (2-3%). En otros tejidos se pueden observar bajas concentraciones, principalmente en el cuerpo lúteo y las glándulas adrenales. De la poza total de carotenoides (100-150 mg), el suero contiene normalmente el 1% (Bendich y Olson 1989). El suero humano contiene como mayores componentes β -caroteno, γ -caroteno, criptoxantina, licopeno y luteína y puede presentar bajas concentraciones de zeaxantina y otras xantofilas y polienos, tales como fitoflueno y fitoeno (Parker 1989).

En bovinos, la deposición de β caroteno en el tejido adiposo representa del 85 al 90% del color (Knight *et al.* 1993; Strachan *et al.* 1993; Yang *et al.* 1993). Knight *et al.* (1993) encontraron que la intensidad del color de la grasa está altamente correlacionada ($r=0.92$) con el contenido de carotenoides y que la concentración de β -caroteno en el plasma está correlacionada con el color de la grasa ($r=0.67$). Estos investigadores reportan que la concentración en plasma de carotenos en bovinos que están en libre pastoreo es de $11.24 \pm 0.12 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno/ml}$.

Se ha observado que pueden existir factores genéticos asociados al color de la grasa en bovinos. Barton y Pleasants (1993) calificaron el color de la grasa subcutánea de diferentes razas durante 5 años consecutivos, obteniendo los resultados observados en el Cuadro 5.

De estos resultados se desprende lo siguiente: dentro de las razas de carne más del 60% de las canales se clasifican como blancas; Angus es la que tiene una coloración de la grasa más amarilla, ya que posee alrededor del 40% de canales con éste problema. De las razas especializadas en producción de leche Jersey y Holstein, son las que presentaron mayor cantidad de canales amarillas.

Cuadro 5. Factores genéticos asociados al color de la grasa

Raza	Color de la grasa (% de canales)		
	1	2	3 ^a
Shorthorn carne	73	17	3
Galloway	66	24	10
Angus	60	25	15
Ayrshire	47	37	16
Friesian	17	40	43
Shorthorn leche	7	38	55
Jersey	7	14	79

^a Calificación: 1 (muy blanca) a 5 (muy amarilla).

Forrest (1981) señala que el mantener a los animales por períodos de 28 a 56 días en corral disminuye el color de la grasa a un nivel aceptable para el mercado canadiense. Este investigador encontró que tras 28 días de mantener a los animales en corral se disminuye la concentración de β caroteno en grasa de 0.28 a 0.17 $\mu\text{g/g}$.

Sin embargo, se desconoce si el cambio de color al alimentar a los animales con dietas a base de granos se debe a la movilización y oxidación de los carotenoides de los depósitos grasos, a la dilución del efecto por la engorda o a ambos (Strachan *et al.* 1993).

Almacenamiento en el hígado

Después de abandonar la célula intestinal, los ésteres de retinilo acarreados en las proteínas de baja densidad del plasma son probablemente hidrolizados por esterasas de las membranas de las células hepáticas (Tee 1992).

Intracelularmente, el retinol no esterificado está ligado a una proteína específica y es transportada al retículo endoplásmico, una vez que es esterificado a ésteres de palmitato. Este luego es transferido y almacenado en un complejo soluble o macromolécula formada por varios tipos de lípidos, varias cadenas de polipéptidos y carbohidratos unidos covalentemente a proteínas (Ross 1993).

La vitamina A tiene una marcada preferencia para almacenarse en el hígado y en este sitio es muy estable. La vitamina A hepática (95% en forma de palmitato de retinil) representa cerca del 90% del total de las reservas corporales de esta vitamina. En cualquier individuo, la magnitud del almacenamiento depende no sólo del consumo de vitamina A y de sus provitaminas, sino también de la eficiencia de absorción y de la tasa de gasto. Estos factores están influenciados por el sexo, la tasa de crecimiento, el estado de salud, etc (Ross 1993; Tee 1992).

El hígado almacena vitamina A continuamente y la libera a la sangre cuando los niveles en la dieta son deficientes. Almacenada como retinol sufre de la acción hidrolítica de la retinil ester hidrolasa. Después de la hidrólisis, el retinol es directamente transferido al sitio de unión de almacenamiento del complejo a la proteína ligadora de retinol para su transporte a otros tejidos. La proteína ligadora de retinol es el acarreador primario del retinol en el plasma, y puede existir en forma holo o apo (Ross 1993; Tee 1992).

Actividad biológica

La actividad biológica de los carotenoides puede dividirse en tres diferentes categorías: funciones, acciones y asociaciones (Bendich y Olson 1989).

Las funciones pueden definirse como papeles esenciales en los cuales toman parte los carotenoides; su ausencia produce alteraciones fisiológicas e incluso la muerte. Las acciones deben ser consideradas como respuestas

fisiológicas o farmacológicas a la administración de carotenoides; sin embargo, las respuestas pueden ser benéficas o perjudiciales. Las asociaciones se definen como correlaciones entre carotenoides y algún evento fisiológico o médico, que pueden mostrar alguna relación causal (Bendich y Olson, 1989).

Cuadro 6. Acciones biológicas de los carotenoides

Funciones	Unos cuantos carotenoides forman vitamina A
Acciones	<ul style="list-style-type: none"> Antioxidantes (bajo PO₂) Pro-oxidantes (alto PO₂) Mejoran la respuesta inmune Pueden mejorar la fertilidad (?) Reducen los neoplasmas fotoinducidos Inhiben la mutagénesis Inhiben la transformacion celular <i>in vitro</i>. Inhiben el desarrollo tumoral <i>in vivo</i> Evitan el intercambio entre cromátidas
Asociaciones	<p>El consumo de alimentos ricos en carotenoides está asociado con:</p> <ul style="list-style-type: none"> Disminución de riesgo de cáncer pulmonar. Disminución de riesgo de otros tipos de cáncer. <p>Los niveles en suero de β caroteno estan inversamente asociados con:</p> <ul style="list-style-type: none"> Conducta fumadora. Riesgo de cáncer pulmonar. Displasia cervical.

(PO₂=presión de oxígeno, adaptado de Bendich y Olson 1989).

En las plantas están bien definidas las siguientes funciones: 1) actividad fotosintética por sí misma y 2) protección del tejido fotosintético contra la foto-oxidación (Olson 1989).

Tejido adiposo

En el organismo hay dos tejidos donde preferencialmente se depositan las grasas: el adiposo y el hepático. El adiposo es un tejido disperso cuya función principal es el almacenamiento de triglicéridos (Guyton 1984; Cartwright 1991). Este tejido es el mayor sitio de síntesis de ácidos grasos en los rumiantes y constituye una reserva dinámica de energía, a través de la cual ocurre del 10 al 80% del flujo energético diario, dependiendo éste de la producción, el tipo de alimento y los requerimientos energéticos en relación al consumo (Emery 1980).

En un inicio, las células grasas acumulan pequeñas gotas de lípidos, hasta formar una gota grande, lo cual es una característica de los adipocitos maduros (Trenkle y Marple 1983; Cartwright 1991). El tejido adiposo crece inicialmente mediante una combinación de agrandamiento (hipertrofia) y proliferación celular (hiperplasia). Se ha observado que en el ganado, la proliferación celular ocurre aproximadamente hasta los 8 meses de edad (20% de su peso vivo adulto); el tamaño celular empieza a incrementarse entre los 4 y los 13 meses de edad (Trenkle y Marple 1983). La incorporación de ácidos grasos al tejido adiposo empieza a partir de las 10 y se incrementa a las 20 semanas de edad (Emery, 1980). El número celular alcanza su meseta y la hipertrofia continúa hasta que la célula alcanza su tamaño máximo. Si en este momento la deposición de grasa continúa (por un excesivo consumo de energía), puede suceder la inducción de hiperplasia y empiezan a aparecer nuevas células pequeñas de grasa (Trenkle y Marple 1983; Leclercq 1984). Sin embargo, existen diferentes patrones de crecimiento; por ejemplo, la hiperplasia es más importante para el crecimiento del tejido adiposo subcutáneo y perirrenal que para el de otras partes del cuerpo en los bovinos. Las células grasas intramusculares son más pequeñas

y contienen más agua que las subcutáneas o las perirrenales y se desarrollan a un ritmo más lento (Trenkle y Marple 1983). Los cambios en el tejido adiposo causados por la nutrición van a depender de la edad y del estado de desarrollo del animal (Trenkle y Marple 1983).

La mayor parte de la grasa corporal de los animales es de color blanco, aunque se ha observado que puede presentarse un tinte amarillento en equinos y bovinos, debido a los carotenos presentes en sus dietas (Frandsen 1986).

Como ya se mencionó, en el caso de los bovinos el color amarillo de la grasa se debe a la presencia de carotenoides, de los cuales el β -caroteno es el dominante, aunque también han sido detectadas pequeñas cantidades de luteína (Barton and Pleasants 1993; Strachan *et al.* 1993; Yang *et al.* 1993).

Se ha observado que al incrementarse el contenido de carotenoides en el tejido adiposo subcutáneo de bovinos hay un incremento significativo del porcentaje total de ácidos grasos cis-monoin saturados y un decremento de los ácidos grasos saturados (Zhou *et al.* 1993).

Para poder implementar, en un futuro, procedimientos y/o productos que eviten la pigmentación amarilla de la grasa de los bovinos finalizados en pastoreo, es necesario primero conocer los patrones de desaparición de β -caroteno a nivel ruminal, el metabolismo de este compuesto a nivel intestinal (es decir, absorción de dicho compuesto y actividad de la enzima 15,15'dioxigenasa) en bovinos y las posibles diferencias con otros rumiantes que no pigmenten la grasa, de tal forma que se puedan atacar puntos claves que prevengan este problema.

III. HIPOTESIS

Existen diferencias ruminales (degradación de β -caroteno), intestinales (a nivel de absorción y de actividad de la enzima 15,15'dioxigenasa) y hepáticas (actividad de la enzima 15,15'dioxigenasa) entre especies rumiantes que pigmentan o no la grasa y que son la causa del amarillamiento de ésta en bovinos finalizados en pastoreo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Conocer el metabolismo de β -caroteno en bovinos y caprinos para establecer diferencias metabólicas entre estas dos especies rumiantes que nos permitan entender el depósito de β -caroteno en la grasa de los bovinos finalizados en pastoreo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Conocer la tasa de desaparición de los principales carotenoides pigmentantes en los forrajes de β -caroteno y luteína, a nivel ruminal en bovinos y caprinos.
- 2) Establecer la relación entre los niveles de β -caroteno en la dieta y las concentraciones de β -caroteno y retinol en el plasma y en diferentes tejidos entre bovinos y caprinos.
- 3) Cuantificar la actividad de la enzima 15,15' dioxigenasa en el intestino e hígado de bovinos (grasa amarilla) y caprinos (grasa blanca)

III. HIPOTESIS

Existen diferencias ruminales (degradación de β -caroteno), intestinales (a nivel de absorción y de actividad de la enzima 15,15'dioxigenasa) y hepáticas (actividad de la enzima 15,15'dioxigenasa) entre especies rumiantes que pigmentan o no la grasa y que son la causa del amarillamiento de ésta en bovinos finalizados en pastoreo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Conocer el metabolismo de β -caroteno en bovinos y caprinos para establecer diferencias metabólicas entre estas dos especies rumiantes que nos permitan entender el depósito de β -caroteno en la grasa de los bovinos finalizados en pastoreo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Conocer la tasa de desaparición de los principales carotenoides pigmentantes en los forrajes de β -caroteno y luteína, a nivel ruminal en bovinos y caprinos.
- 2) Establecer la relación entre los niveles de β -caroteno en la dieta y las concentraciones de β -caroteno y retinol en el plasma y en diferentes tejidos entre bovinos y caprinos.
- 3) Cuantificar la actividad de la enzima 15,15' dioxigenasa en el intestino e hígado de bovinos (grasa amarilla) y caprinos (grasa blanca)

V. *In vitro* and *in situ* disappearance of β -carotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay, in bovine and caprine ruminal fluids

Ofelia Mora^{1/}, José L. Romano^{2/}, Armando Shimada^{1,2/}, Felipe J. Ruiz^{2/} and Elvira González^{3/}

^{1/} Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México

^{2/} Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP-SAGAR

^{3/} Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro

* Correspondence: Apartado postal 2-29. Querétaro, Qro. 76020. México.

Abstract

Two experiments were conducted to determine the ruminal fluid disappearance rates (kd) of β -carotene, lutein, total carotene and total xanthophyll from lucerne (*Medicago sativa*) hay, in two ruminant species: Brahman steers (fat-pigmenting) and Granadine goats (non-fat pigmenting). Within species, the *in vitro* and the *in situ* methods were compared. The concentration of carotenoid compounds was determined by spectrophotometry and high performance liquid chromatography. The *in vitro* disappearance trends were linear for all compounds ($P < 0.01$). β -carotene kd were 0.13 and 0.37; lutein 0.2 and 0.25; total carotene 0.2 and 0.62 and total xanthophyll 0.3 and 0.77 % h⁻¹ for steers and goats, respectively. The *in situ* disappearance trends were quadratic ($P < 0.01$). Dry matter kd were 1.9 and 1.5% h⁻¹; cellular content 2.0 and 2.3; β -carotene, 2.5 and 1.2; lutein, 2.5 and 1.5; total carotene, 2.2 and 1.0 and total xanthophyll, 2.1 and 1.1 % h⁻¹ for steers and

goats, respectively. The large disappearance rates of carotenoids observed in the *in situ* method vs the virtual absence of disappearance in the *in vitro* method in both species, can be related to the dry matter and cellular content kd. These results suggest that carotenoids disappear probably by joining the cellular content and not by their direct destruction or by attack from the ruminal microorganisms, and the ruminal disappearance is independent of the species studied.

Key words:

ruminal fluid, steers, goats, β -carotene, lutein, disappearance rate

INTRODUCTION

Carotenoids are yellow to orange-red pigments that are ubiquitous in nature and are synthesized only by plants. Animals depend entirely on feed as sources of carotenoids and cannot synthesize them *de novo*; they can however metabolize them or convert them into other carotenoids (Hencken 1992; Tee 1992). The conversion of carotenoids is specific to a given animal species.

Unlike some other ruminants such as sheep and goats, cattle absorb significant quantities of β -carotene (β C) from the diet and, since not all the absorbed, β C is transformed to vitamin A, the surplus is then deposited into the body adipose tissues as well as secreted in milk fat (Hencken 1992; Larson *et al* 1993; Yang *et al* 1993).

Yellow fat pigmentation in cattle finished on pasture represents an important economic loss for the producer, because of the downgrading or even rejection of the resulting carcasses; despite this, there is little information available on the mechanisms that cause this problem and the metabolic processes that the absorbed β C undergoes (Yang *et al* 1992).

β -carotene is the major carotenoid detected in the serum and adipose tissue of cattle; it accounts for 85-90% of the color in beef fat and the color's intensity is primarily correlated ($r=0.92$) with its carotenoid content and secondarily with lutein (LU) content (Yang *et al* 1992; Knight *et al* 1993).

There is also little information on the microbial transformation and metabolism of β C in the rumen. Shorland *et al* (1957) conducted *in vitro* trials with ovine ruminal fluid and observed that β C was not destroyed in it. King *et al* (1962) reported reticulo-ruminal losses of β -carotene and vitamin A when they were incubated *in vitro* in bovine rumen fluid. Recovery from fluid inoculated with β C and vitamin A but from non-incubated tubes averaged 97.5 % and 81.1 %; whereas that from incubated (9 h) tubes averaged 65.6% and 60.4%, respectively. Davison and Seo (1963) added nitrate to lucerne hay and incubated the material *in vitro* with bovine rumen liquor and found no differences in carotene destruction between nitrate-fed and control animals nor effect of the addition of nitrate to the *in vitro* system; they incubated samples for 7 h and the destruction of β C was between 20 and 27%. Keating *et al* (1964) used ethoxyquin and potassium nitrate to determine the *in vitro* destruction of β -carotene; this appeared to be little affected by treatments and the average recuperation was 83.4 % at 3.5 h and 72.7 % at 16 h of incubation.

Van Soest (1982) suggests that due to the presence of a double conjugated-bond system in an all-trans position, carotenoids are more resistant to hydrogenation and can escape to the small intestine. Westendorf *et al* (1990) estimated that the destruction of β C at the ruminal level was between 20 to 40%.

Sinha (1984) used caprine ruminal liquor and observed that there was a significant destruction of β C by rumen microbes (50.8% in 4 h) and that supplementation of antibiotics such as aureomycin and terramycin did not significantly reduce the destruction (62-65% in 4h).

The objective of this study was to determine the disappearance rate of β C and LU from lucerne hay, in bovine and caprine ruminal fluids, measured by the *in vitro* and *in situ* methods.

MATERIALS AND METHODS

Animals, diet and techniques

Four Brahman steers weighing 350 kg each were used in experiment 1 and three Granadine female goats weighing 32 kg each in experiment 2; all were fitted with permanent rumen cannulae. They were fed lucerne hay *ad libitum*, 14 days prior to the start of the experiments. The chemical composition of the forage is shown in Table 1.

Disappearance rates were measured by the *in vitro* technique proposed by Tilley and Terry (1963) and the *in situ* method described by Mehrez and Ørskov (1977).

Incubation procedure and handling of samples

Samples of lucerne hay were prepared by grinding them through a 2 mm mesh, and they were incubated in triplicates in both methods. The incubation times were 0, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 h. In both *in vitro* trials 1 g samples were incubated at 37 C in darkness. At the end of incubation time they were frozen at -4 C in amber vials and immediately lyophilized to reduce degradation by light or temperature (Schmitz *et al* 1993).

In the case of the *in situ* trial, 10 and 5 g of alfalfa hay (for steers and goats, respectively) were weighed into synthetic bags of pore size 40 μ m which were then inserted into the rumen at 0, 32, 48, 56, 60 and 62 h and then removed all together at 64 h. After retrieval, bags were washed with tap water. They were rinsed to estimate the highly soluble component. After removal, the *in situ* samples were

dried in a forced-air oven at 35 C and covered with aluminum foil, as in the *in vitro* method, to reduce degradation by light or temperature (Schmitz *et al* 1993). Samples were analyzed for dry matter and neutral detergent fiber.

Chemical analyses

- Standards. Synthetic type 1 all-trans- β -carotene and lutein from alfalfa (Sigma Chemical Co.) were used to determine the concentrations of β C and LU in lyophilized and dry samples of alfalfa ; they were analyzed in a spectrophotometer (SP) model Beckman Du-65 and a high performance liquid chromatograph (HPLC), model Perkin Elmer Integral 4000, to determine for each one, the absorbance and area under the curve. The results were subjected to regression analyses and the equations were applied to obtain the concentrations on all samples.

- Carotenoid analyses. The extraction of carotenoids from samples was performed using the technique described by the AOAC (1990) for dried plant materials, with cold saponification.

1) To quantify the total carotene (TC) and the total xanthophyll (TX) extracted, a 1:10 dilution (extract:hexane) (Craft 1992) was made and read using the spectrophotometric method described by AOAC (1990).

2) The determination of β C and LU was done using the Bushway Method (Burreau and Bushway 1986) for HPLC, using the same standards as in TC and TX. Operation conditions were: column nova pak C18 60Å 4mm, solvent system acetonitrile-tetrahydrofurane-water (77.5:20:2.5) with a flow of 1 ml/min. Twenty μ l were injected for both samples and standards.

Statistical design

With both methods and species the disappearance percentages of β C, LU, TC and TX for each incubation time were calculated; as were the DM and CC in the case of *in situ* method. These results were subjected to a regression analysis to evaluate the

disappearance trend and to determine the regression equation (linear, quadratic or cubic) that best fitted the model (SAS 1988).

The model used was:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 t_i + \beta_2 t_i^2 + \beta_3 t_i^3 + e_i$$

where:

y_i is the disappearance percentage of sample i ;

β_0 is the y's axis intercept

$\beta_1 t_i$ is the time linear regression coefficient

$\beta_2 t_i^2$ is the time quadratic regression coefficient

$\beta_3 t_i^3$ is the time cubic regression coefficient

e_i is the experimental error.

Calculation of degradation rate

The degradation data obtained for β C, LU, TC, TX, DM and CC were fitted to a first-order model and the k_d of β C, LU, TC, TX, DM and CC were calculated for *in situ* and *in vitro* methods, following the equation proposed by Nocek and English (1985):

$$R = -kt + R_0$$

where:

R is the natural logarithm (\ln) of residual percentage to β C, LU, TC, TX, DM and CC ($t > 0$)

$-k$ is the disappearance rate (slope)

t is the time (hours)

R_0 equals DM, β C, LU, TC and TX residual when $t=0$ (y's axis intercept).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 2 shows the disappearance percentages observed for β C, LU, TC and TX *in vitro*. Regression analyses showed that the disappearance percentages of β C, LU, TC and TX by the *in vitro* method had a linear trend ($P < 0.01$). Equations were for β C, $y = 0.063 + 0.001x$ and $y = 0.084 + 0.001x$; LU, $y = 0.076 + 0.002x$ and $y = 0.017 + 0.002x$; TC, $y = 0.047 + 0.002x$ and $y = 0.218 + 0.0009x$; TX, $y = 0.063 + 0.003x$ and $y = 0.048 + 0.002x$, for steers and goats, respectively. These *in vitro* results show lower disappearance rates of β C than the ones reported by King *et al* (1962) and Keating *et al* (1964), who obtained losses of 27.3 to 34.4 % between 9 and 16 incubation hours and Davison and Seo (1963) who said that rumen microorganisms are capable of destroying 19.3 to 25.2% of β C in 7 h. In our study the observed percentages were 10.52 to 10.56 between 8 and 16 hours for steers and 9.16 to 9.90 for goats. The differences in our results probably indicate that the β C losses in the reports by King *et al* (1962), Davison and Seo (1963) and Keating *et al* (1964) were due more to light or/and temperature degradation than to ruminal microbial destruction.

Table 3 shows the disappearance percentages with the *in situ* method. In this case, the trend was quadratic ($P < 0.01$), equations were for β C, $y = 0.59 + 0.013x - 0.00013x^2$ and $y = 0.63 + 0.013x - 0.00013x^2$; LU, $y = 0.52 + 0.016x - 0.00016x^2$ and $y = 0.56 + 0.015 - 0.00016x^2$; TC, $y = 0.69 + 0.01x - 0.00010x^2$ and $y = 0.72 + 0.010x - 0.00011x^2$; TX, $y = 0.65 + 0.011x - 0.00011x^2$ and $y = 0.68 + 0.011x - 0.00012x^2$, respectively for steers and goats. The inflection point of each curve, calculated by taking the first derivative of the corresponding equation, for each carotenoid is as follows (x,y) : β C (52.3 h, 94.5 %) (47.0 h, 92.9%); LU (48.8 h, 125.8%) (47.9h, 90.3%); TC (50.0 h, 94.6%) (44.7h, 94.6%) and TX (50.0 h, 90.0%) (45.5h, 93.1%), respectively for steers and goats. In the case of LU for steers this point did not indicate any inflection of this curve.

Disappearance rates of β C, LU TC, TX and DM for both methods are presented in Table 4. King *et al* (1962) found losses *in vivo* of 40 % for β C and noted that they were independent of small intestine passage. However, most disappearance observed *in situ*, compared with our disappearance *in vitro*, can be related with the DM and CC kd. This effect reveals similarity among kd of DM and both carotenoids (89% DM- β C and 92.5% DM-LU ; $P < 0.01$). These results corroborate the statement by Van Soest (1982) who indicates that carotenoids probably escape to the small intestine without being degraded in the reticulo-rumen. Contrary to what was indicated by Westendorf *et al* (1990), carotenoids, specially β C, are not destroyed at the ruminal level.

ACKNOWLEDGEMENTS

The experiments were part of a project financed by: *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (L0062 B9607); Programa de Apoyo a la Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Nacional Autónoma de México; Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C.; Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro. The work was part of the Doctoral thesis presented by the senior author to the National University of Mexico. Thanks are extended to Mr. Peter Kelly who revised the English of the manuscript.

REFERENCES

- Association of Official Analytical Chemists 1990 *Official Methods of Analysis* (15th edn). Arlington : Association of Official Analytical Chemists. Washington.
- Burreau J L and Bushway R J 1986 HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. *Journal of Food Science* **51** 128-130.
- Craft N E 1992 Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **40** 431-434.

- Davison K L and Seo J 1963 Influence of nitrate upon carotene destruction during *in vitro* fermentation with rumen liquor. *Journal of Dairy Science* **46** 862-864.
- Hencken H 1992 Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science* **71** 711-717.
- Keating E K, Hale W H and Hubbert F 1964 *In vitro* degradation of vitamin A and carotene by rumen liquor. *Journal of Animal Science* **25** 111-117.
- King T B, Lohman T G and Smith G S 1962 Evidence of rumino-reticular losses of vitamin A and carotene. *Journal of Animal Science* **21** 1002.
- Knight T W, Ridland M, Hill F I, Death A F and Wyeth T K 1993 Effects of stress and nutritional changes on the ranking of cattle on plasma carotene concentrations. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* **53** 455-456.
- Larson T W, Yang A and Tume R K 1993 The *in vitro* destruction of rumen fluid carotenoids by plant lipoxygenases. *Biochemistry and Molecular Biology International* **30** 197-207.
- Mehrez R and Ørskov E R 1977 Study of the artificial bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* **88** 645-650.
- Nocek J and English J 1985 *In situ* degradation kinetics: evaluation of rate determination procedure. *Journal of Dairy Science* **69** 77-87.
- Schmitz H H, Poor C L, Gugger E T and Erdman J W 1993 Analysis of carotenoids in human and animal tissues. *Methods in Enzymology* **24** 102-116.
- Shorland F B, Weenink R O, Johns A T and McDonald I R 1957 The effect of sheep-rumen contents on unsaturated fatty acids. *Biochemistry Journal* **67** 328-331.
- Sinha R R 1984 Influence of antibiotics on carotene destruction during the *in vitro* incubation of goat's rumen liquor. *Indian Journal of Animal Health* **23** 129-132.
- Statistical Analysis System 1988 *SAS/SAT^o User's Guide*. Release 6.03 Edition. Cary, N.C.: SAS Institute Inc.

- Tee S E 1992 Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **31** (1/2) 103-106.
- Tilley J M and Terry RA 1963 A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grasslands Society* **18** 104-111.
- Van Soest P J 1982 *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O & B Books, Inc, Corvallis, Oregon, USA. pp. 260-263.
- Westendorf M L, Mitchell G E, Gay N, Tucker R E and Bradley N 1990 Plasma vitamin A levels in cattle in response to large doses of vitamin A. *International Journal of Nutrition Research* **60** 314-319.
- Yang A, Larsen T W and Tume R K 1992 Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* **43** 1089-1817.
- Yang A, McLennan S R, Armstrong J, Larsen T W, Shaw F D and Tume R K 1993 Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. *Australian Journal of Agricultural Research* **44** 215-220.

Table 1. Chemical composition of lucerne hay in dry matter basis^a

Component	Mean		SD	
	Steers	Goats	Steers	Goats
Dry matter , %	17.88	18.54	0.14	0.13
Neutral detergent fiber, %	32.65	39.70	0.11	0.12
Cellular content, %	67.50	60.30	0.11	0.12
β-carotene, µg g-1	27.65	34.85	5.81	6.24
Lutein, mg g-1	1.15	2.20	0.19	4.15
Total carotene, µg g-1	42.10	56.42	6.30	6.66
Total xantophylls, mg g-1	1.19	2.50	0.19	3.80

^a Mean ± SD, N=6

Table 2. Mean observed disappearance percentages of β -carotene, lutein, total carotenes and total xanthophyll in steers (S) and goats (G) ruminal fluid by an *in vitro* method.

Hour	β -carotene		Lutein		Total carotenes		Total xanthophylls	
	S n=12	G n=9	S n=12	G n=9	S n=12	G n=9	S n=12	G n=9
2	1.75	8.60	1.63	2.10	1.63	12.01	0.36	5.26
4	5.46	8.79	6.81	2.46	6.81	12.18	6.02	5.74
8	10.52	9.16	6.84	3.18	6.84	12.21	11.05	6.68
16	10.56	9.90	9.50	4.61	9.50	13.39	15.68	8.56
32	11.03	11.39	12.31	7.46	12.31	24.97	20.54	12.33
64	11.87	14.37	16.80	13.18	16.80	28.12	23.44	19.86

Table 3. Disappearance percentages of β -carotene, lutein, total carotene and total xanthophyll in steers (S) and goats (G) ruminal fluid by *in situ* method.

Hour	β -carotene		Lutein		Total carotenes		Total xanthophylls	
	S	G	S	G	S	G	S	G
	n=12	n=9	n=12	n=9	n=12	n=9	n=12	n=9
2	57.63	65.58	49.11	59.51	69.70	73.80	65.23	70.14
4	65.76	67.98	59.81	62.33	73.31	75.66	70.18	72.19
8	71.94	72.44	66.76	67.59	78.68	79.13	74.43	75.99
16	79.49	80.08	77.34	76.60	84.85	85.00	82.34	82.43
32	85.90	89.66	84.71	88.33	89.41	90.17	87.36	88.93
64	91.28	90.18	90.07	88.57	91.96	92.44	90.49	90.73

Table 4. Disappearance rates ($\% \cdot h^{-1}$) of β -carotene (β C), lutein (LU), total carotene (TC), total xanthophyll (TX), dry matter (DM) and cellular content (CC), in steers (S) and goats (G) by *in vitro* and *in situ* methods.

	<i>In vitro</i>				<i>In situ</i>			
	kd		r2		kd		r2	
	S	G	S	G	S	G	S	G
β C	0.13	0.37	0.11	0.15	2.5	1.2	0.85	0.81
LU	0.20	0.25	0.28	0.14	2.5	1.5	0.84	0.81
TC	0.20	0.62	0.29	0.15	2.2	1.0	0.75	0.81
TX	0.30	0.77	0.36	0.26	2.1	1.1	0.77	0.87
DM	---	---	---	---	1.9	1.5	0.94	0.91
CC	---	---	---	---	2.0	2.3	0.96	0.94

VI. Presence of Fed β -carotene in Digesta and Tissues of Holstein Steers

O. Mora*, A. Shimada*¹+, J. L. Romano+, E. González-de-Mejía‡, F. J. Ruiz+, and R. Gómez++

* Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 2-29, Querétaro, Qro., México,

+ Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Ajuchitlán, Qro., México,

‡ Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro., México and

++Patronato del Centro de Investigaciones Pecuarias del Estado de Sonora, A.C. Hermosillo, Son., México.

Abstract

The objective of this trial was to determine the effect of the dose of β -carotene fed to steers on their β -carotene and retinol concentrations in blood serum, digestive fluids, faeces and selected tissues. Eight Holstein steers in four treatments in two periods were fed a diet without β -carotene for 49 days and then supplemented with β -carotene 0, 5.5, 44 or 352 mg/kg dry matter during 30 days. Steers were slaughtered at the end of the second period. Concentrations of β -carotene were: 0, 0, 227.2 and 2011 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ($P<0.05$) in ruminal fluid; 0, 0, 533.7 and 4418 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ($P<0.05$) in duodenal fluid; 0, 4.03, 14.91 and 90.64 $\mu\text{g}/\text{g}$ ($P<0.05$) in dry faeces; 0.8, 1.2, 4.7 and 8.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ ($P<0.05$) in liver; 0.07, 0.15, 0.5 and 3.7 $\mu\text{g}/\text{g}$ ($P<0.05$) in subcutaneous fat; 0, 0, 0.1 and 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ ($P<0.05$) in kidney fat for 0, 5.5, 44 and

352, respectively. No retinol was detected in ruminal or duodenal fluids or in faeces; concentrations in liver were affected by the dose of β -carotene: 101.1, 113.6, 161.7 and 199.6 ($P < 0.05$); no differences in retinol were found in subcutaneous or kidney fat ($P > 0.1$). Apparently all β -carotene could be absorbed, however there seems to be a limit to the β -carotene storing capabilities of tissues. The result suggests that its possible that the enzyme 15,15'-dioxygenase could be saturated.

Keywords: yellow fat, Holstein steers, β -carotene, retinol

¹ To whom correspondence should be addressed.

Introduction

Cattle can absorb significant quantities of β -carotene from the diet and because not all of it is transformed into vitamin A, the surplus is then deposited in various organs and adipose tissue, as well as secreted in milk fat (Hoppe *et al.* 1996; Yang *et al.* 1993). β -carotene is the major carotenoid detected in the blood serum and adipose tissue of cattle; it accounts for 85-90% of the colour in beef fat and the colour's intensity is correlated ($r=0.92$) with its carotenoid content. Lutein also could be detected in adipose tissue of bovines (Yang *et al.* 1992; Knight *et al.* 1993).

Excessive fat colour is regarded as undesirable, and seriously affects some markets (Yang *et al.* 1993). Beef carcass grading systems in many countries include the measurements of fat colour, as certain markets have a dislike of carcasses with excessively yellow fat.

Little information is available on the mechanisms that cause this problem in cattle, nor is it known why the adipose tissue of some other ruminants consuming the same pastures is unaffected.

The aim of this study was to investigate the effect of the concentration of feed β -carotene in cattle's blood serum levels, its kinetics in the digestive tract and its deposit in selected tissues.

Materials and Methods

Animals and diets

Eight Holstein steers with an average weight of 345.6 ± 53.4 kg were obtained from a commercial herd and fitted with ruminal and duodenal cannulae. Throughout the experiment, they were maintained in individual pens and offered the diet described in Table 1 in amounts equivalent to 2.2% of their body weights in dry matter (DM); individual feed intake was recorded daily.

Body weights were recorded every 30 days from the date of arrival, and the dry matter intakes were adjusted accordingly. The diet was developed to allow a standardized dietary treatment and for the depletion of tissue β -carotene and

retinol stores.

At the end of the experiment, the animals were slaughtered, without food-deprived, by captive bolt gun followed by exsanguination. All procedures were in accordance with the laws of the State of Querétaro for Animal Care.

Representative samples of liver, subcutaneous and kidney fat were collected. They were frozen and stored at -70°C until analysis.

Experimental layout

The experiment was divided into two periods of 79 days each. Each period was subdivided in two: washout and β -carotene supplementation. During the washout phase of 49 days, animals were fed a diet without added β -carotene, to allow the serum β -carotene concentration to return to baseline concentrations. In the last 30 days steers were randomly assigned to one of four treatments. The treatments were 0, 5.5, 44 or 352 mg β -carotene per kg of DM added to the diets daily.

The 5.5 mg dose was calculated assuming a requirement of vitamin A of 2200 IU kg^{-1} of dry feed (NRC 1989; 1996), that 1 mg of β -carotene is equivalent to 400 IU of vitamin A, and that all the β -carotene is theoretically converted into vitamin A. The 352 mg dose was the hypothetical amount that animals grazing exclusively on a rye grass type pasture would receive per kg of DM. The 44 mg dose was geometrically calculated to lie in between the values. The supplemented β -carotene was a commercial product containing 10% β -carotene (Lucarotin®, BASF, Ludwigshafen, Germany). Digesta markers were used for the estimation of apparent absorption of β -carotene, faecal output and the kinetics within the digestive tract.

Sample collection

In both 49-day washout periods, samples of blood serum were obtained every 7 days. During the 30 days of β -carotene supplementation, samples of serum, ruminal, duodenal fluid and feces were obtained on days 1, 10, 20 and 30. With the exception of serum, that was taken only once daily, all other samples were obtained every 4 hours (0800, 1200, 1600, 2000 2400 and 0400) and composited

to have a single sample for each day. All samples were stored in amber tubes and frozen at -70°C until analysis.

Serum analyses

Aliquots (1 mL) of serum were denatured by the addition of 1 mL ethanol. β -carotene and retinol were then extracted with 2 mL hexane followed by 1 mL diethyl ether and 1 mL of water. The upper layer was taken for analysis by HPLC (Yang *et al.* 1992).

Rumen and duodenal fluid analyses

Duplicate 1 mL aliquots of each fluid were denatured by the addition of an equal volume of absolute ethanol containing butylated hydroxytoluene (BHT) (1.0 g/L). The mixture was extracted five times with 5 mL of hexane, the superior layer was pipetted into a 25 mL volumetric flask and brought to volume with hexane. A 2 mL aliquot of the hexane extract was evaporated to dryness under nitrogen and the residue was reconstituted with 400 μL of methylene chloride and then was injected into the HPLC system (White *et al.* 1993).

Faeces analyses

Five g of fresh faeces were blended in a high-speed blender, with 20 mL acetone, 30 mL hexane and 0.05 g MgCO_3 , for 5 min. Residues were decanted into a separator, then washed with two 12.5 mL portions of acetone. The hexane layer was evaporated under nitrogen and the residue was reconstituted with 1 mL of ethanol. It was injected into the HPLC system (AOAC 1990).

Fat analyses

One gram of fat tissue was hydrolyzed in 2 mL 20% KOH in methanol at 65°C for 45 min and then 6 mL of water were added. β -carotene and retinol were extracted twice with 8 mL of diethyl ether and extracts were washed 3 times with an equal volume of water to remove KOH. The extracts were evaporated to dryness under nitrogen. The residue was redissolved in 200 μL ethanol and injected into the HPLC (Yang *et al.* 1992).

Liver analyses

One gram of liver was ground with 2-3 g of sodium sulfate and 100 mg of ascorbic acid and then hydrolyzed in 3 mL of 20% KOH in methanol at room temperature overnight in the dark. Carotenoids and retinol were extracted three times with 3 mL of hexane. The superior layer was evaporated under nitrogen. The residue was redissolved in ethanol and injected into the HPLC (Yang *et al.* 1992)

Instrumentation

An HPLC system was used to determine β -carotene and retinol; it included an Integral 400 Perkin-Elmer and a spectrophotometer detector LC-95 UV/Vis Perkin-Elmer, Norwalk, CT. Separations were performed on a Waters (Milford, MA) Nova-Pak C18 analytical column. β -carotene and retinol were eluted isocratically with acetonitrile-tetrahydrofuran-water (77.5:20:2.5, v/v/v) at a flow rate of 1 mL/min, with β -carotene detection at 460 nm and retinol detection at 325 nm. In all cases a 15 μ L aliquot was injected into the HPLC system.

Marker administration and sampling

To estimate solid passage rate, mean retention time and gastrointestinal tract fill, we used sorghum straw labeled with $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($143.8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DM}$) in a single-dose procedure (Pond and Ellis 1988; Pond *et al.* 1989). Animals were dosed at 0800 and samples of faeces were obtained from each animal at 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96 and 120 h postdosing. To prepare the samples for ytterbium reading we used a wet ashing procedure as described previously by Romano-Muñoz (1994). Two-compartment gamma age-dependent models were proved to describe the passage process (G3G1, G4G1 and G5G1) as described by Quiroz *et al.* (1988). $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was used to determine the DM digestibility, using the formula recommended by Pond *et al.* (1992) to calculate the faecal output :

$$\text{FO, g/d} = \frac{\text{Marker dosed, } \mu\text{g} \cdot L_1 \cdot 24 \cdot 0.59635}{k_0, \mu\text{g/g}}$$

Where:

FO= faecal output,

k0 = concentration of marker if instantaneously mixed in the compartment,

L₁ = age dependent rate parameter.

The Co-EDTA complex was used as the liquid phase marker (Udén *et al.* 1980). Animals received a 100 mL intraruminal dose of a liquid with a Co concentration of 3540 mg L⁻¹. Steers were dosed at 0800 and samples of ruminal fluid obtained from each animal at 2, 4, 6, 10, 16 and 24 h postdosing. Analyses were performed as described by Moore *et al.* (1990).

Quantification of Yb and Co was done by atomic absorption spectrophotometry (Yb Mod. 3280 and Co Mod 4000 Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The parameters used for readings of Yb were: wavelength 398.8, slit width 0.2 and flame gases nitrous oxide-acetylene; for Co they were wavelength 240.7, slit width 0.2 and flame gases air-acetylene.

Statistical analyses

Data were analyzed as a completely randomized design with repeated measures in time. Hepatic and adipose tissue β-carotene and retinol concentrations were compared among treatment groups by one-way ANOVA using the general linear model of SAS (SAS 1988). β-carotene and retinol concentrations in serum, ruminal and duodenal fluids and faeces were subjected to a regression analysis to determine the disappearance trend and the regression line that best fitted the model (SAS 1988).

Results and Discussion

The steers' mean body weight was 345.6 kg (SD 53.4) at the start of the experiment, 392.9 kg (SD 69.2) at the start of the second period and 417.8 (SD 77.3) at the end of the experiment. In view of the restricted feed intake, a low but adequate mean growth rate of 457 g/d was obtained. Growth rate was not significantly affected by treatment ($P>0.1$).

β -carotene and retinol concentrations in blood serum

The concentration of β -carotene in serum at the start of the experiment was 0.002 $\mu\text{g/mL}$ (± 0.001), lower than the value (1.85 $\mu\text{g/mL}$) reported by Yang *et al.* (1993). Comparisons of β -carotene and retinol concentrations in serum in both washout periods are shown in Figure 1. For the first washout period, β -carotene concentrations were close to zero. Probably this was due to the fact that these animals were feedlot cattle and had not received any fresh plant material 8 months prior to the beginning of this experiment. In the second period the β -carotene serum concentration fell gradually, but in general it seems that 49 days were enough to eliminate β -carotene from circulation (but not necessarily from the tissues).

In the case of retinol, its concentration in the second washout period was higher than in the first one, maybe due to the conversion of β -carotene into the former in the liver.

Figure 2 shows that except for the 0 dose, the behavior of β -carotene in serum for the 30 days supplementation, was linear ($P<0.01$), as was reported by Hope *et al.* (1996) with preruminant calves, although they observed a plasma steady-state concentration after 28 days. A steady-state could be reached because animals could have a finite capability of storing β -carotene in tissues and this capability could depend on the the amount of adipose tissue present, which is a function of age, among other things. Thus, the calves in Hope *et al.* (1996) experiment reached a steady-state sooner than the steers in this experiment, which actually did not show a steady-state. Treatment 0 did not adjust to any kind of regression ($P>0.1$).

In Figure 3 it can be observed that the behaviour of retinol throughout the 30 days of supplementation was similar among treatments ($P>0.1$) and the respective regressions were cubic, which might indicate that regardless of the dose of β -carotene fed, the retinol formed was similar and had a tendency to stabilize. This could possibly be due to saturation of 15,15'-dioxygenase (maybe by substrate) or to an insufficient quantity of the enzyme responsible for converting β -carotene into vitamin A, which is present mainly in gut and liver (in most of the species studied).

β -carotene and retinol concentrations in rumen, duodenum and faeces

The effect of different levels of β -carotene in ruminal and duodenal fluids and faeces is shown in Table 2. In the case of ruminal fluid, no β -carotene was found in the 5.5 treatment. Nothing of the compound fed remained in the rumen, probably because of passage of β -carotene into the duodenum. In treatments 44 and 352 more of this compound remained in the rumen, and it was probably not destroyed at the ruminal level, as has been previously reported (Mora *et al.* in press). The same tendency was observed for duodenal fluid, but in the case of faeces the excretion of β -carotene increased as a function of the β -carotene fed.

Figure 4 shows an increase in the concentrations of β -carotene in the rumen, throughout the 30 days of supplementation similar to the one found by Yang *et al.* (1993). It is interesting to note that for all treatments (except 0) the ratio of β -carotene concentration between days 10 and 20 was 2.25, between days 20 and 30 was 2.36 (both equal $P>0.1$) and between days 10 and 30 was 5.33. This means that there was an increase in β -carotene ruminal concentration after 20 days of supplementation ($P<0.01$).

Figure 5 also shows, an increase in the concentration of β -carotene in duodenal fluid during the 30 days of supplementation. In this case β -carotene ratios between days were all different ($P<0.01$): 3.6 between days 10 and 20; 1.7 between days 20 and 30 and 6.2 between days 10 and 30.

Figure 6 shows that there were no differences in β -carotene excretion within treatment between 10 and 30 days of supplementation, because the ratios

FALTA PAGINA

No.

52

carotene or of storing retinol. The behaviour of retinol in liver was quadratic, similar to that of β -carotene. This means that both liver and subcutaneous fat have a limit capability to store β -carotene and retinol, but β -carotene also be stored in other tissues (e.g. ovaries, lungs, adrenals).

Ruminal kinetics

Figures 9 and 10 depict the change with time of the marker concentration in faeces and ruminal fluid, respectively. Both curves were obtained from the mean estimates of all animals. For rate of passage, the model selected was G3G1 because it had the smallest residual sum of squares (Quiroz *et al.* 1988). The parameters fitted were tabulated and compared among treatments by ANOVA using the general linear model of SAS (SAS 1988). No significant differences were found ($P>0.05$), and the parameters estimated were: $\lambda=0.185$ (SD=0.133), $K_2=0.022$ (SD=0.007), $\text{TAU}=11.327$ (SD=3.941), mean retention time $h=23.92$ and passage rate 8.96 h^{-1} . The dilution rate was $8.8\% \text{ h}^{-1}$. The estimate of DM digestibility was 53.9%.

The results of this experiment showed that after 30 days of supplementation, β -carotene could still be absorbed from the intestine, regardless of dose. However, it is possible that the enzyme 15,15'-dioxygenase could be saturated, as indicated by the results from the retinol data. The lack of information on the metabolism of β -carotene in bovines suggests that there is a need for further studies to understand the mechanisms that control the absorption and deposition of β -carotene in tissues, specially in adipose tissue.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by the National Council of Science and Technology - CoNaCyT (Project L0062-B9607) and is part of the Doctorate thesis that the senior author submitted to the National Autonomous University of México. The authors wish to thank Dr. Juan de Dios Garza Flores for performing the surgical procedures, BASF Mexicana S.A. for the generous donation of the Lucarotin® and for revising the English of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Association of Official Analytical Chemists. (1990) Official Methods of Analysis, 15th Edn. Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- Hoppe, P.P., Chew, B. P., Safer, A., Stegemann and Biesalski, H. K. (1996) Dietary β -carotene elevates plasma steady-state and tissue concentrations of β -carotene and enhances vitamin A balance in preruminant calves. *Journal of Nutrition*. **126** :202-208.
- Knight, T. W., Ridland, M., Hill, F. I., Death, A. F. and Wyeth, T. K. (1993) Effects of stress and nutritional changes on the ranking of cattle on plasma carotene concentrations. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. **53**:455-456.
- Moore, J. A., Poore, M. H., and Swingle, R.S. 1990. Influence of roughage source on kinetics of digestion and passage, and on calculated extents of ruminal digestion in beef steers fed 65% concentrate diets. *Journal of Animal Science*. **68**: 3412.
- Mora, O., Romano, J.L., Shimada, A., Ruiz, F., and González, E. In vitro and in situ disappearance rates of β -carotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay, in bovine and caprine ruminal fluids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Accepted.
- National Research Council (1989) Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press, Washington, D.C.
- National Research Council (1996) Nutrient Requirements of Beef Cattle. National Academy Press, Washington, D.C.
- Pond, K. R. & Ellis, W. C. (1988) Compartment models for estimating attributes of digesta flow in cattle. *British Journal of Nutrition*. **60**:571-595.
- Pond, K. R., Ellis, W. C., Matis, J. H. & Deswysen, A. G. (1989) Passage of chromium-mordanted and rare earth-labeled fiber: time of dosing kinetics. *Journal of Animal Science*. **67**:1020-1028.
- Pond, K. R., Luginbuhl, J. M., Burns, J. C., Fisher, D. S. and Buntix, S. 1992.

- Estimating intake using rare earth markers and controlled release devices. *Journal Series of North Carolina ARS*. Paper No. 12300. Raleigh, NC U.S.A.
- Quiroz, R. A., Pond, K. R., Tolley, E. A. & Johnson, W. L. (1988) Selection among nonlinear models for rate of passage studies in ruminants. *Journal of Animal Science*. **66**:2977-2986.
- Romano-Muñoz, J.L. (1994) Relationship of thyroid hormones and digesta kinetics as affected by heat stress in wool and hair sheep. Ph.D. Thesis. North Carolina State University, Raleigh.
- Statistical Analysis System (1988). SAS/STAT User's Guide: Release 6.03 Edition. Cary, NC: SAS Institute.
- Uden, P., Colucci, P. E. & Van Soest, P. J. (1980) Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **31**:625-632.
- White, W. S. , Peck, K. M., Ulman, E.A. & Erdman, J. W. (1993) The ferret as a model for evaluation of the bioavailabilities of all-trans- β -carotene and its isomers. *Journal of Nutrition*. **123**:1129-1139.
- Yang, A., Larsen, T.W & Tume, R. K. (1992) Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*. **43**:1809-1817.
- Yang, A., McLennan, S. R., Armstrong, J., Larsen, T.W., Shaw, F.D. & Tume, R. K. (1993) Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. *Australian Journal of Agricultural Research*. **44**:215-220.

Table 1. Composition of experimental diet

Component	kg/mTon
Sorghum straw	830
Sugarcane molasses	62.6
Blood meal	50
Sorghum, grain	40
Mineral premix	20
Urea	13
NaCl	2.4
Calcium orthophosphate	2

Table 2. Effect of level of β -carotene (β C) fed to Holstein steers on its concentration in ruminal liquor, duodenal fluid and faeces.

β C mg/Kg DM intake	0	5.5	44	352	SEM
Ruminal fluid, μ g/dL	ND	ND	227.2 ^a	2011 ^b	136.8
Duodenal fluid, μ g/dL	ND	ND	533.7 ^a	4418 ^b	305.5
Dry feces, μ g/g	ND	4.03 ^a	14.91 ^a	90.64 ^b	26.2

Values are means. Within rows, values with different superscripts are significantly different $P < 0.05$, $n = 4$ animals per treatment

ND= Not detectable

SEM= Standard error of the mean.

Table 3. Effect of level of β -carotene (β C) fed to Holstein steers on its concentration in tissues, μ g/g

β C mg/Kg DM intake	0	5.5	44	352	SEM
Liver	0.8 ^a	1.2 ^a	4.7 ^b	8.1 ^c	0.7
Subcutaneous fat	0.07 ^a	0.15 ^a	0.5 ^a	3.7 ^b	0.57
Kidney fat	ND	ND	0.09 ^a	0.23 ^b	0.04

Values are means. Within rows, values with different superscripts are significantly different $P < 0.01$, $n = 4$ animals per treatment

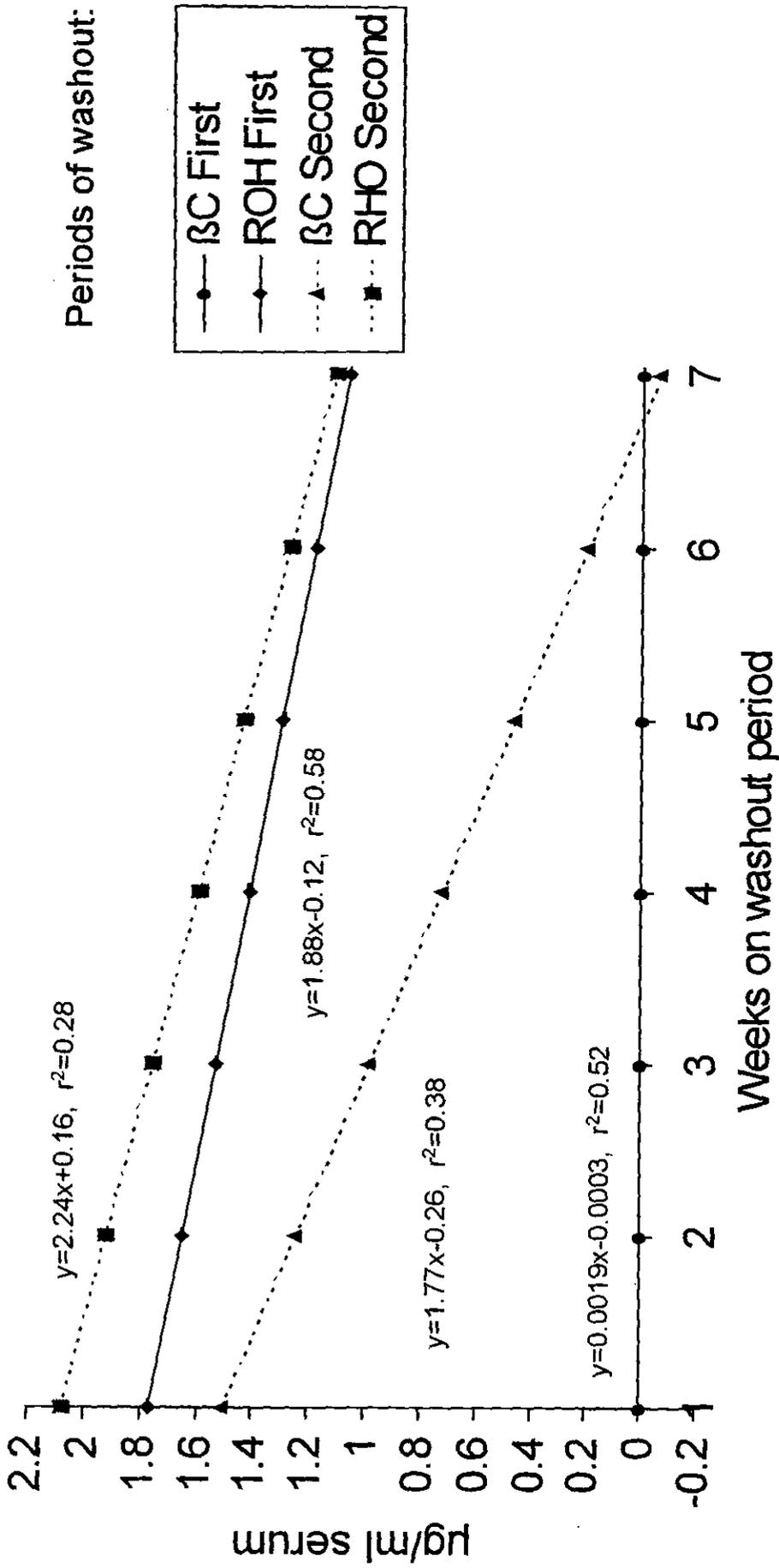
ND=Not detectable

SEM= Standard error of the mean.

Table 4. Effect of level of β -carotene fed to Holstein steers on the retinol concentration in tissues, $\mu\text{g/g}$

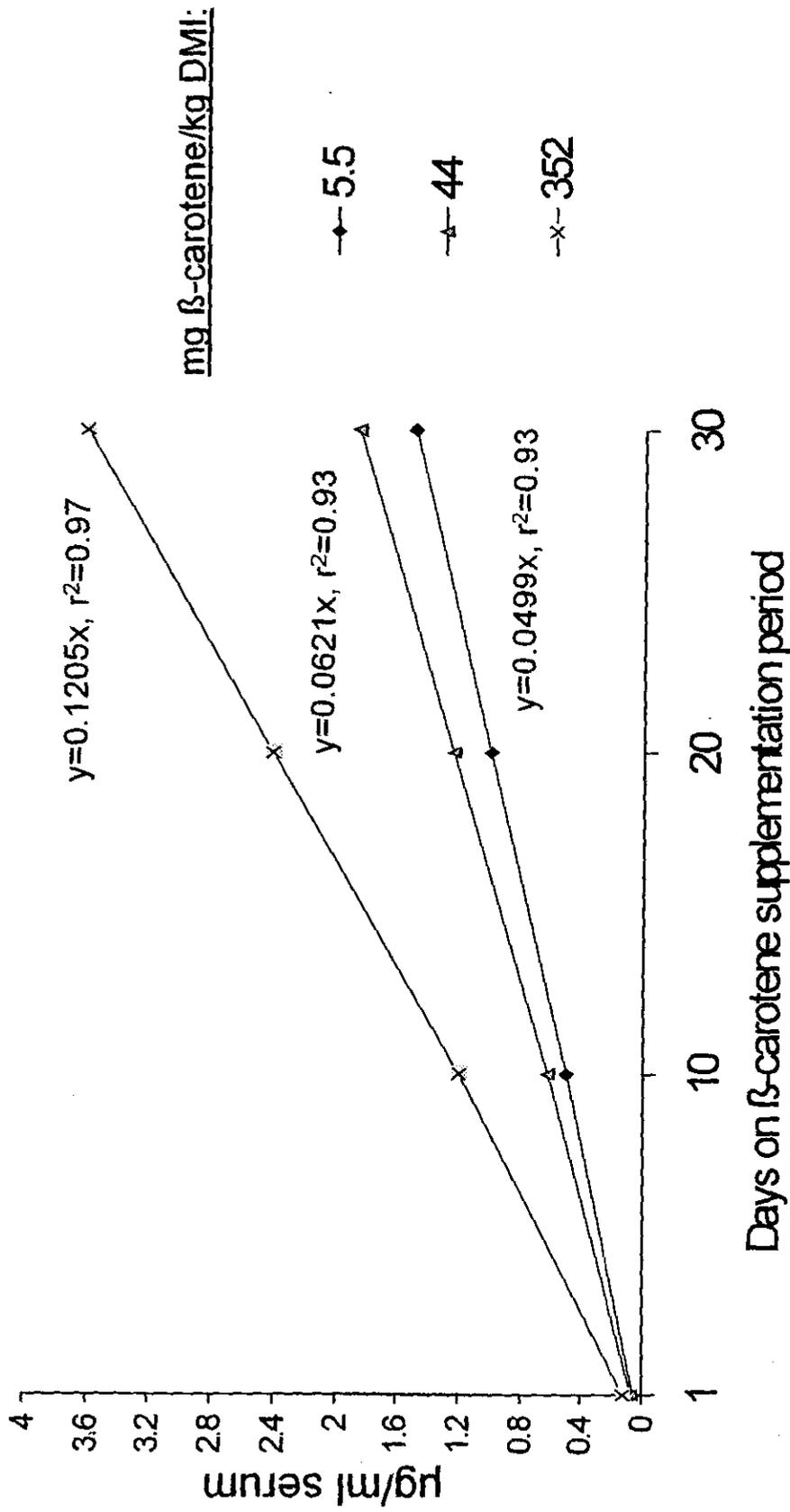
$\beta\text{C mg/Kg DM intake}$	0	5.5	44	352	SEM
Liver	101.1 ^a	113.6 ^a	161.7 ^b	199.6 ^b	13.96
Subcutaneous fat	0.9	1.0	1.0	1.0	0.08
Kidney fat	1.0	0.9	0.9	0.9	0.04

Values are means. Within rows, values with different superscripts are significantly different $P < 0.01$, $n = 4$ animals per treatment
SEM = Standard error of the mean.



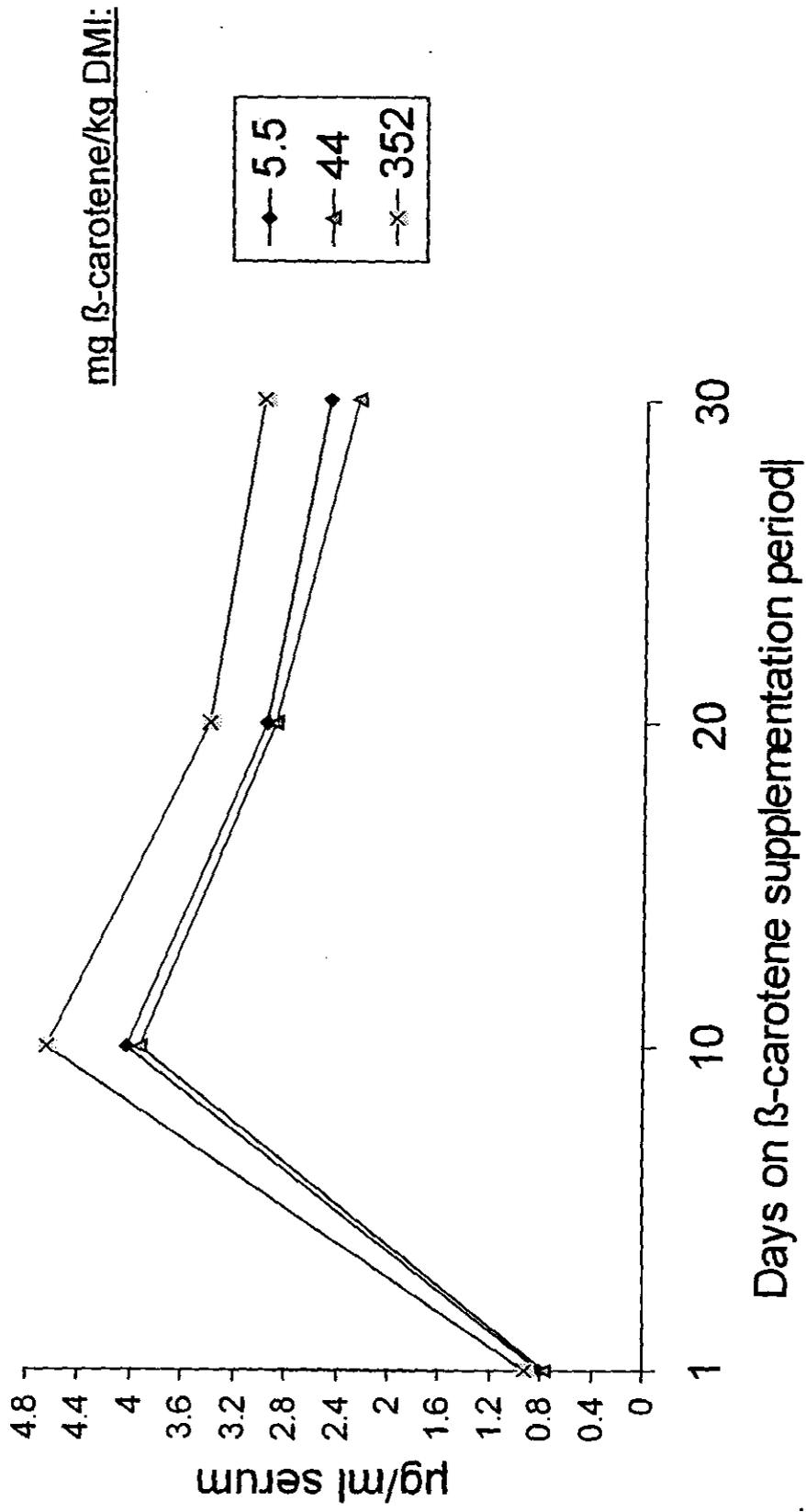
n=8, P<0.01

Figure 1. Serum concentrations of β -carotene (β C) and retinol (ROH) during washout periods



n=4, P<0.01

Figure 2. Effect of fed β -carotene on its concentration in serum



Equations:

5.5: $y=0.85x+0.05x^2+0.0009x^3, r^2=0.98$

44: $y=0.82x+0.05x^2+0.0009x^3, r^2=0.97$

352: $y=0.98x+0.06x^2+0.0001x^3, r^2=0.97$

n=4, P<0.01

Figure 3. Effect of fed β -carotene on the concentration of retinol in serum

FALTA PAGINA

No. 63

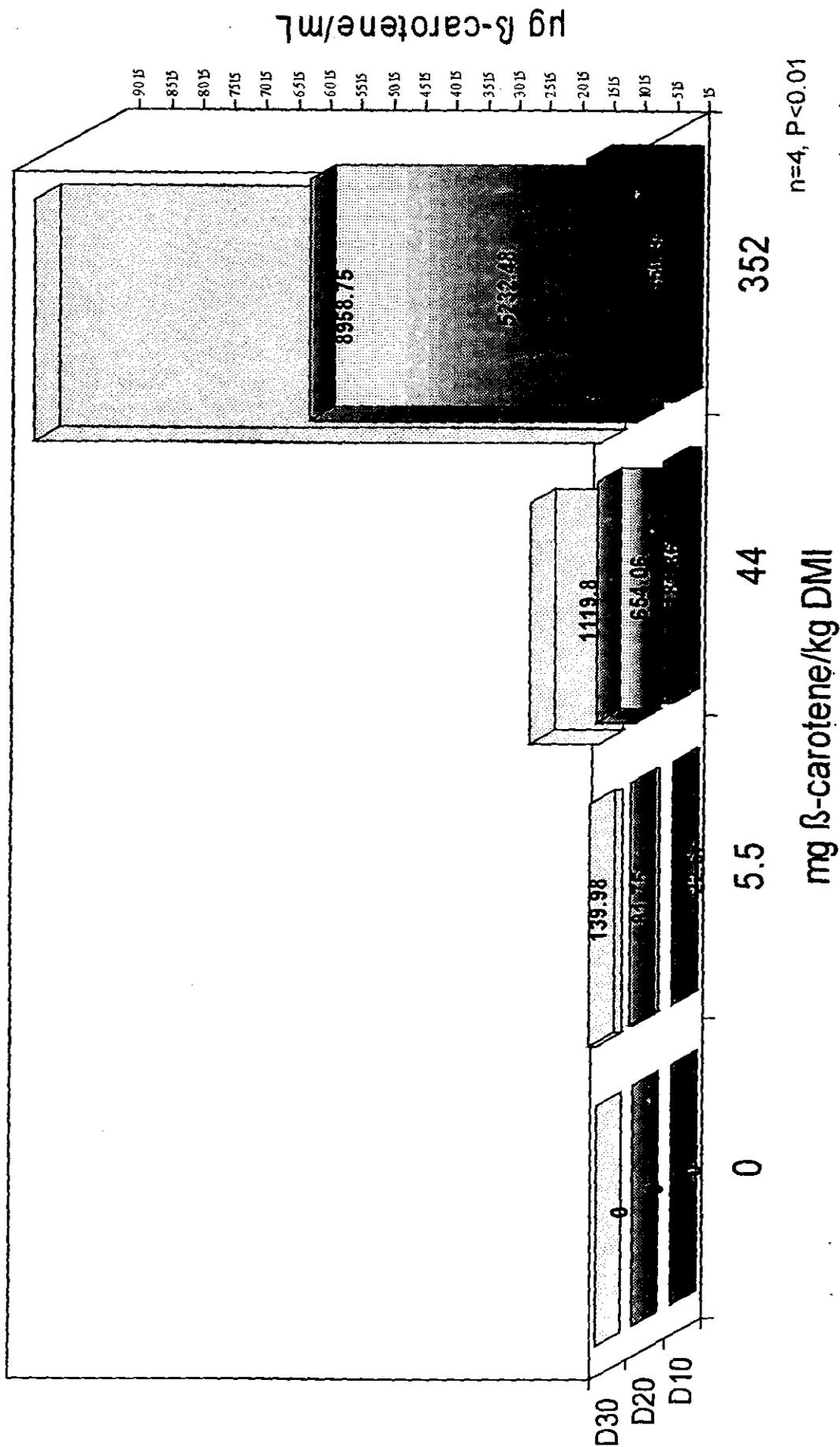


Fig. 5 Effect of level of fed β -carotene on its concentration in duodenal fluid during 10, 20 and 30 days (D)

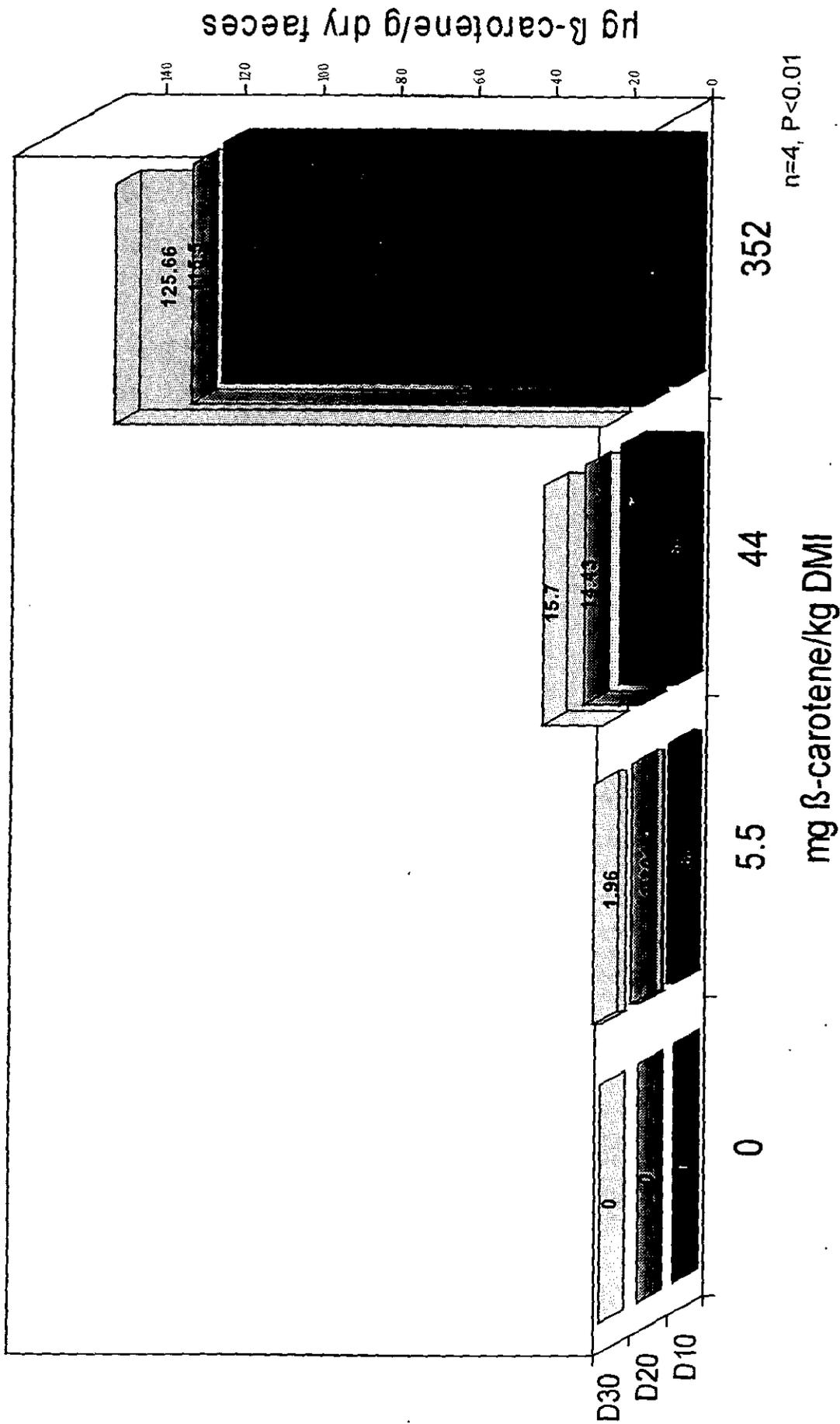


Fig. 6 Effect of level of fed β-carotene on its concentration in faeces during 10, 20 and 30 days (D)

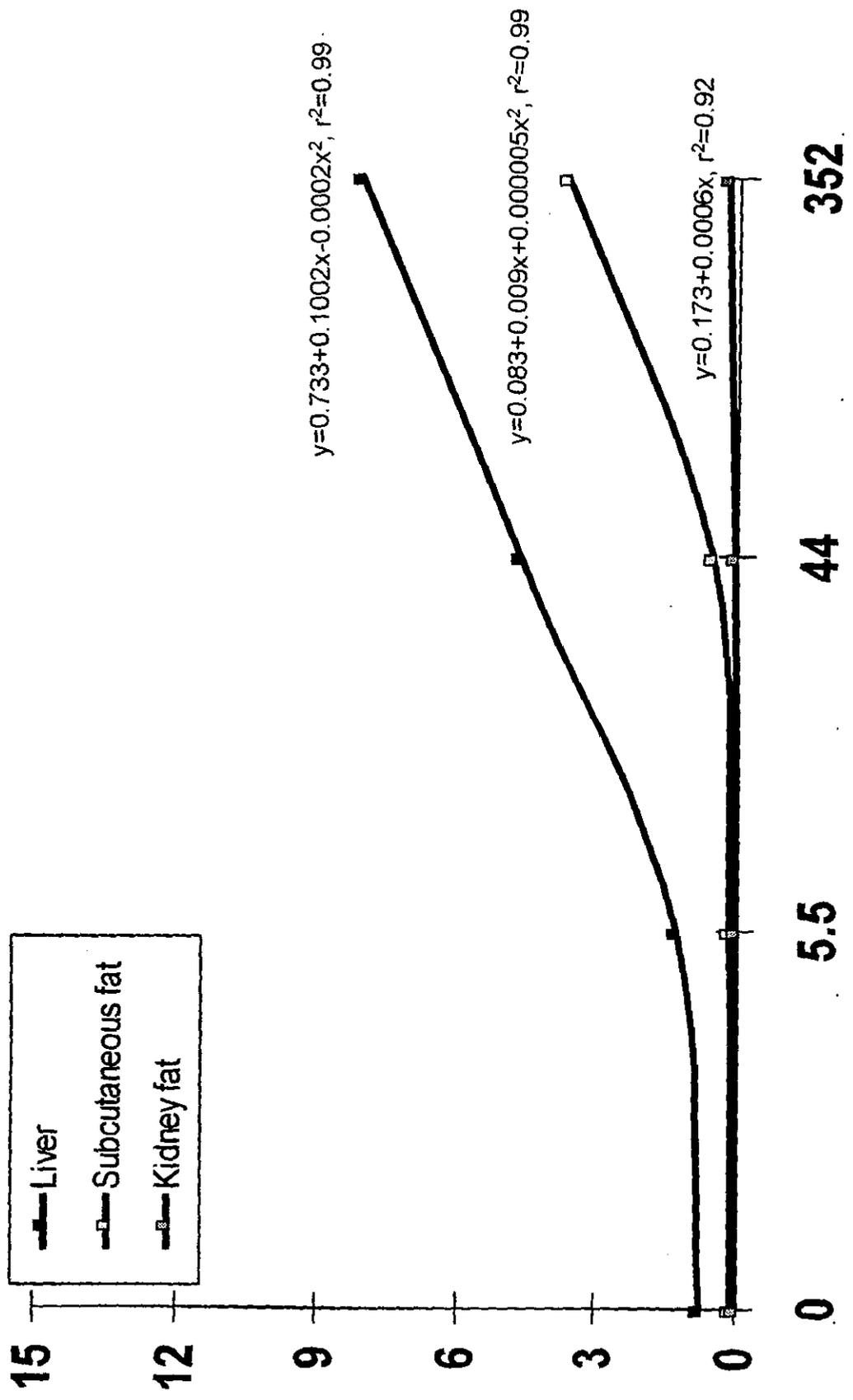


Figure 7. Behaviour of β -carotene concentration in the liver and adipose tissue

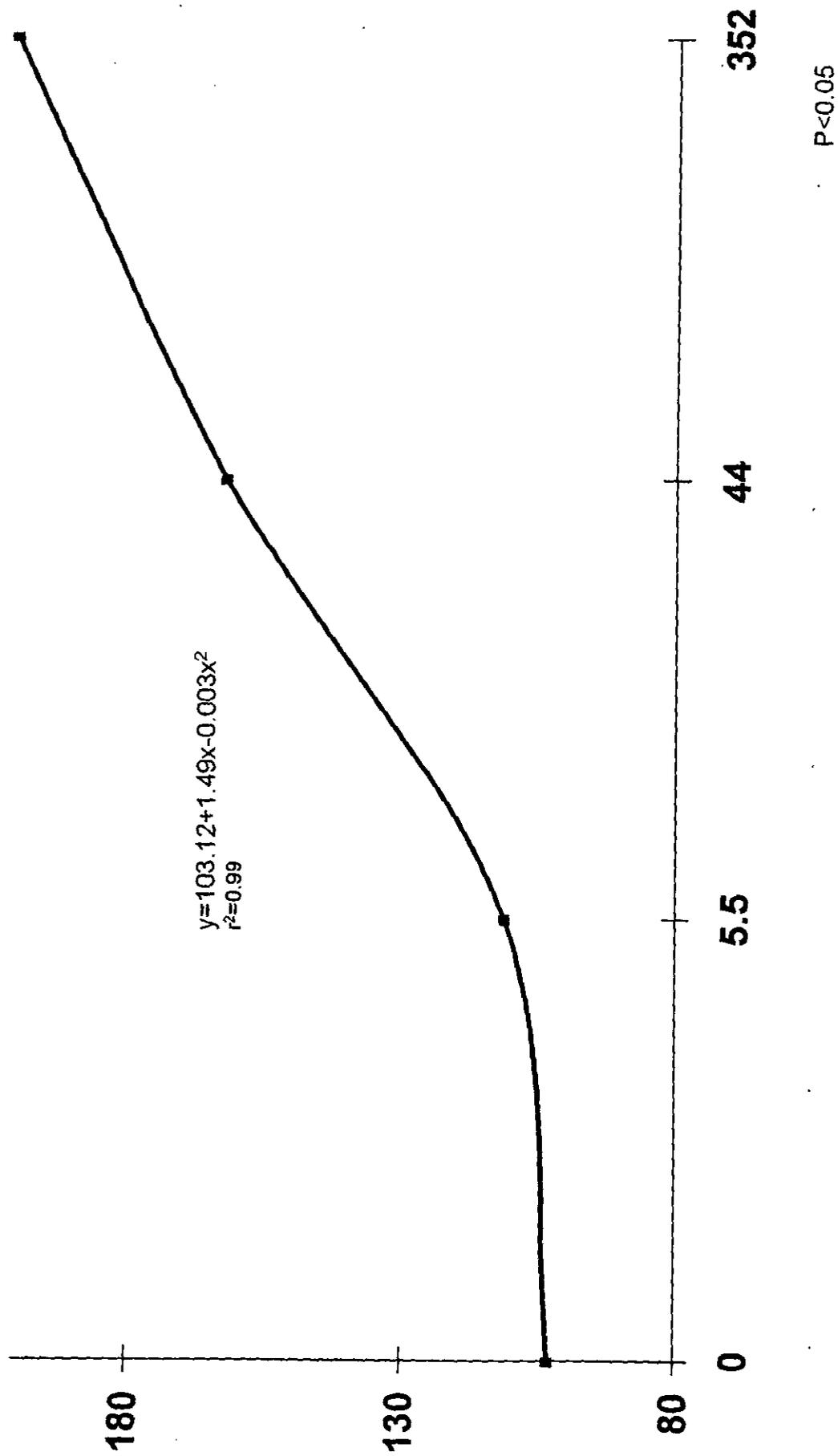


Figure 8. Behaviour of retinol concentration in the liver

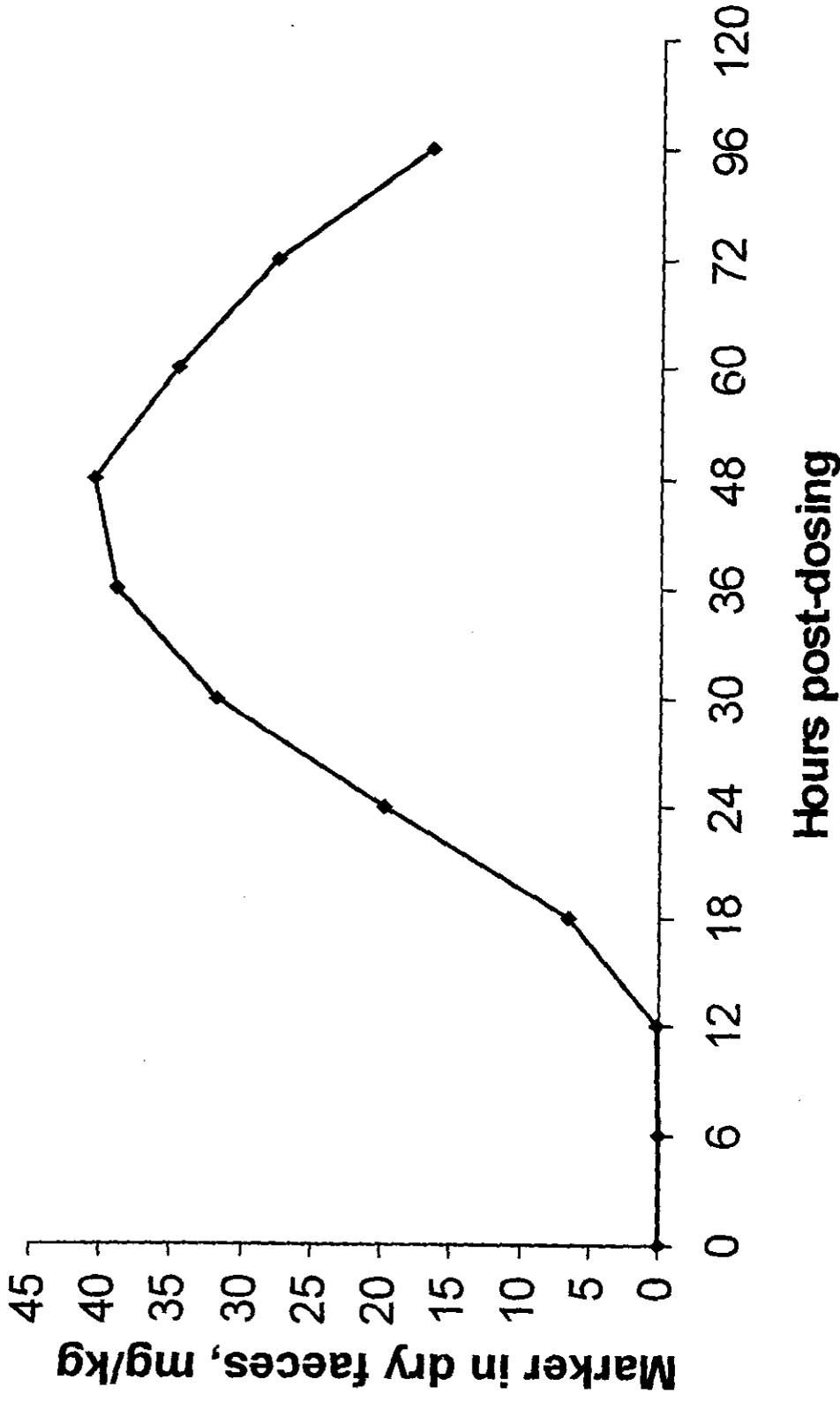


Figure 9. Concentration of marker (Yt) in faeces after administration

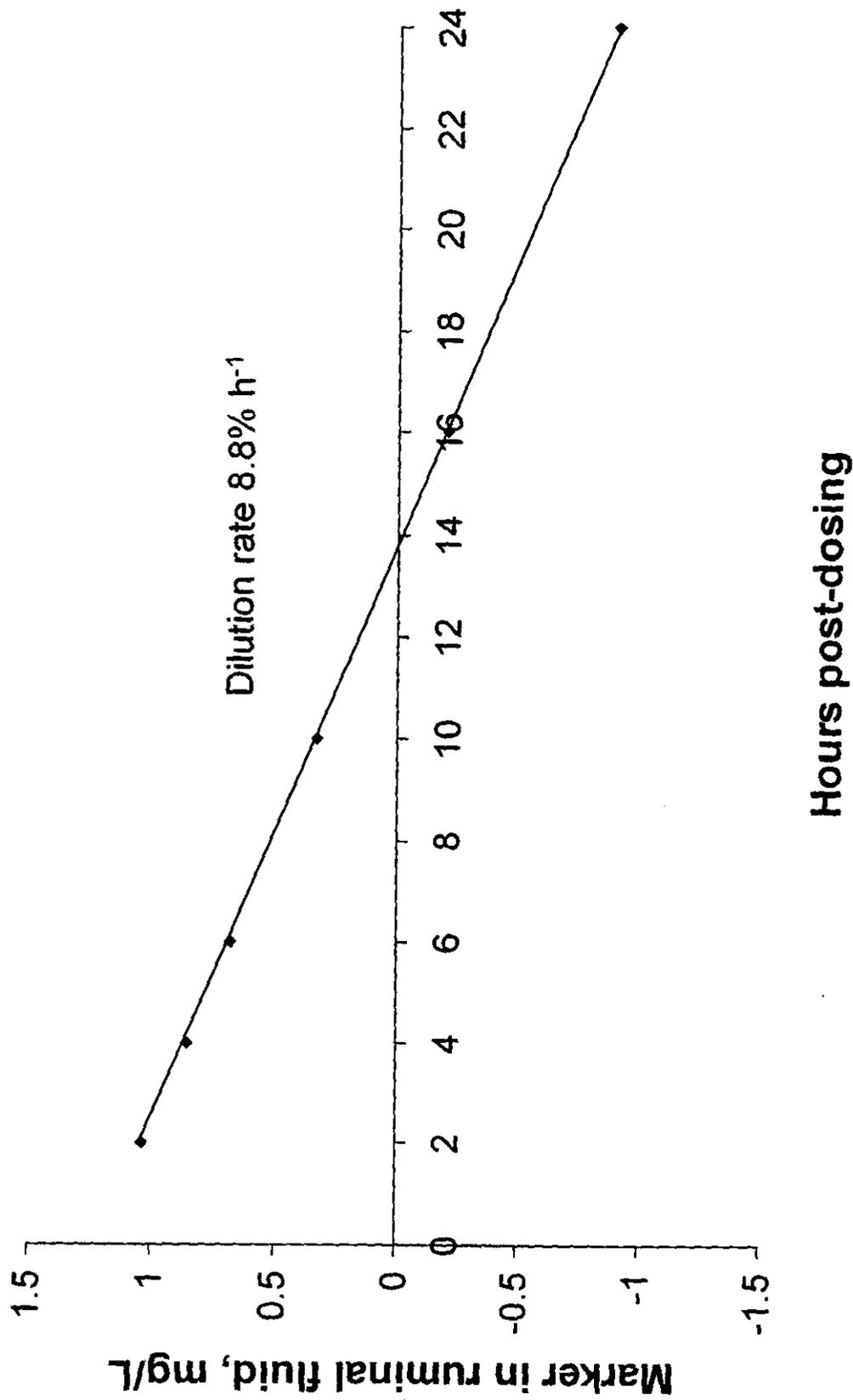


Figure 10. Concentration of marker (Co) in ruminal fluid after administration to calculate the dilution rate

VII. Intestinal Absorption of β -carotene and Cleavage Activity of 15,15' dioxygenase in Cattle and Goats¹

*O. Mora**, *A. Shimada**²*, *J. L. Romano⁺*, *E. González-de-Mejía[‡]*, and *F. J. Ruiz⁺*

* Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 2-29, Querétaro, Qro., México,

+ Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Ajuchitlán, Qro., México,

‡ Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro., México

ABSTRACT

Twelve heifers (adipose tissue pigmenting ruminant) and 14 goats (non-pigmenting ruminant) were used to evaluate the effect of fed β -carotene on its absorption, the activity of cleaving enzyme 15,15'dioxygenase and the concentration of β -carotene and retinol in selected tissues. The experiment lasted 120 days; during the first 90 days animals were offered a β -carotene free diet. In the following 30 days, they were distributed to one of three treatments: 0, 5.5 or 352 mg of β -carotene/kg of dry matter intake, under a completely randomized design. All animals were then slaughtered. Fed β -carotene did not affect growth rate ($P>0.1$). In bovines, no interactions between treatments and intestinal portions

¹ This project was supported by the National Council of Science and Technology-CoNaCyT (Project L0062-B9607) and is part of the Doctorate thesis that the senior author submitted to the National Autonomous University of México.

² To whom correspondence should be addressed.

were found ($P>0.2$) for the activity for 15,15 dioxygenase. With respect to β -carotene fed levels, results were: 0.192, 0.322 and 0.446 nmol retinal/mg S-9 protein/h ($P<0.01$) for 0, 5.5 and 352 mg β -carotene, respectively; for intestinal portions results were 0.446, 0.431 and 0.083 ($P<0.01$) nmol retinal/mg S-9 protein/h for duodenum, jejunum and ileum, respectively. Caprine data showed an interaction between treatment and intestinal portion ($P<0.05$) for the activity for 15,15 dioxygenase; results were for treatment 0: 1.4, 1.404 and 0; for treatment 5.5: 1.406, 1.423 and 0.128; and for treatment 352: 1.464, 1.994 and 0.481 nmol retinal/mg S-9 protein/h for duodenum, jejunum and ileum, respectively. The results show differences in 15,15' dioxygenase activity between ruminant species that can explain differences in the pigmentation of adipose tissue.

INDEXING KEY WORDS: angus heifers, goats, β -carotene, dioxygenase cleavage

Grass-fed cattle generally have yellow fat due to the presence of carotenoid pigments, of which β -carotene is predominant (Strachan et al. 1993). Cattle can absorb significant quantities of β -carotene from the diet but because not all the absorbed β -carotene is transformed into vitamin A, the surplus is then deposited in various sites including adipose tissues and liver, which accumulate substantial amounts of intact carotenoids. Excess of β -carotene can also be excreted in milk fat (Hoppe et al. 1996; Yang et al. 1993). However, not all ruminants have yellow fat, as ruminant species have different biochemical and physiological pathways for dealing with carotenoid absorption, deposition and metabolism (Yang et al. 1992). A β -carotene cleaving enzyme was described in 1965 (Olson and Hayaishi; Goodman and Huang), but 15,15'dioxygenase has not yet been purified and its action mechanism and differences among species still remain to be elucidated; thus it is unknown whether those differences affect the deposition of carotenoids in the fat tissue.

The aim of this study was to evaluate the effect of the level of fed β -carotene on the activity of the cleaving enzyme in bovines and caprines and the deposition of the compound and retinol in selected tissues.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets. Twelve Angus heifers and fourteen crossed goats averaging 224.5 ± 28.4 and 11.5 ± 3.7 kg, respectively, were used. They were housed in individual pens, received the feed described in Table 1, and had free access to water. Diets were prepared every 10 days and in each time samples were taken for dry matter and crude protein analyses. Animals received the equivalent of 2.6% of their body weight in dry matter daily; feed intakes were measured daily, and animals were checked daily for any visible signs of health disturbances. Body weights were recorded every 14 days, and the dry matter intakes were adjusted accordingly. The diet was developed to allow a standardized dietary treatment and the depletion of tissue β -carotene and retinol stores to baseline levels. All animal procedures were in compliance with the regulations of the State of Querétaro for Animal Care.

At the end of the experiment all animals were slaughtered, without food-deprived, by captive bolt gun followed by exsanguination. Livers were weighed and small intestines measured lengthwise. Representative samples of liver, subcutaneous and perirenal fat were collected, frozen and stored at -80°C until analysis.

Experimental design. The experiment was divided into two phases: washout and β -carotene supplementation. During the washout, which lasted 90 days, animals were fed the unsupplemented β -carotene diet, to allow for the β -carotene serum concentration to return to baseline values. On following 30 days of β -carotene supplementation, animals were randomly assigned to one of treatments: 0, 5.5 and 352 mg β -carotene $\cdot\text{kg}$ dry matter intake $^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (equivalent to 0, 0.01024 and 0.6556 mmol $\cdot\text{kg}^{-1}$ dry matter intake). The supplemented β -carotene was a commercial

product containing 10% of the compound (Lucarotin®, BASF, Ludwigshafen, Germany³). The 5.5 dose was calculated using the NRC recommendations for beef cattle (NRC, 1996) and the 352 dose was the amount that would be consumed by animals grazing on a rye grass pasture. The same doses were used in goats. The estimation of the diet's apparent digestibility was performed using digesta markers to calculate fecal output.

Sample collection. On days 30, 60 and 90 of washout, plasma samples were obtained three times daily. On days 1, 10, 20 and 30 of β -carotene supplementation plasma and feces were sampled. Plasma was sampled once daily; feces, every 4 hours and mixed to obtain a composite sample for each day. All samples were stored in amber tubes and frozen at -80°C until later analysis.

Plasma analyses. Blood was collected by venipuncture to the jugular vein in heparinized tubes, stored on ice and protected from sunlight. Plasma was separated by centrifugation within 4 h and stored at -80°C. Aliquots (1 mL) were deproteinated with one volume of ethanol and extracted using two volumes of hexane (van Vliet et al. 1996).

Feces analyses. Five grams of fresh feces were blended in a high-speed blender, with 20 mL acetone, 30 mL hexane and 0.05 g MgCO₃ for 5 min. Residues were decanted into a separator, washed with two 12.5 mL portions of hexane, then with 12.5 mL of acetone. Acetone was washed with five 50 mL portions H₂O, the upper layer transferred to 50 mL volumetric flask containing 4.5 mL acetone and diluted to volume with hexane. 100 μ L of the hexane layer were injected into the HPLC system (AOAC 1990).

Liver and adipose tissue analyses. One gram of liver was ground with 3 g of sodium sulfate and 100 mg of ascorbic acid and hydrolyzed in 3 mL 20% KOH in methanol at room temperature overnight in the dark. β -carotene and retinol were extracted three times with 3 mL of hexane each time, the hexane layer was evaporated under nitrogen and the residue was reconstituted with 0.5 mL of water-

³ Gift from BASF Mexicana S.A de C.V.

free acetone. 100 μ L were injected in the HPLC system. One gram of fat tissue was hydrolyzed in 2 mL of 20% KOH in methanol at 65°C for 45 min and then 6 mL of water were added. β -carotene and retinol were extracted twice with 8 mL of diethyl ether and extracts were washed 3 times with an equal volume of water to remove the KOH (Yang et al. 1992).

Enzymatic assay. The proximal 100 cm of duodenum, 50 cm of jejunum and 50 cm of ileum were flushed with ice-cold NaCl buffer and then cut lengthwise; the mucosa was flushed again with the same buffer and scraped off with a glass slide. The intestinal scrapings were homogenized with a teflon pestle in 50 mL potassium phosphate buffer 100 mmol/L, pH 7.7 containing 4 mmol/L $MgCl_2$, 30 mmol/L nicotinamide and 1 mmol/L dithiotreitol (van Vliet et al. 1993; van Vliet et al. 1996). Five grams samples of liver dorsal lobules were taken and homogenized in one volume of a 100 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 7.4, with 50 mmol/L KCl in an Ultra-Turrax homogenizer (van Vliet et al. 1996). Aliquots of intestine and liver homogenates were frozen immediately and stored at -80°C. The intestinal mucosa and the liver samples were used to prepare a 9000 x g supernatant (S-9) by centrifugation for 20 min using a microcentrifuge Beckman J2-MC (Mijdrecht, Netherlands) with a JS-13.1-140 rotor. Small subsamples of S-9 were stored at -20°C for protein analyses, using the method described by Bradford (1976).

The 15,15'-dioxygenase assay (EC 1.13.11.21) was performed as described previously by van Vliet et al. (1996). The product formed was retinal, and it was proportional to the amount of enzyme present.

HPLC analyses. All extracts were evaporated under nitrogen at room temperature. Residues were dissolved in water-free acetone and transferred into brown HPLC injection vials. Retinyl acetate was used as the internal standard. An HPLC system, which included a Hewlett Packard 1100 System with DAD, was used to determine β -carotene, retinol and retinal. Retinal was separated on a Nucleosil 100 Å 250x4.6 mm (Phenomenex, USA); the mobile phase consisted of

acetonitrile-100 mmol/L ammonium acetate (72:25, v/v). The ammonium acetate was acidified to pH 4.65 with acetic acid. Retinol and β -carotene in all samples were separated on a Hypersil ODS 5 μ m 150x4.6 mm (Chadwick Road, England) with a mobile phase of acetonitrile-methanol-methylene chloride-water (70:15:10:5, v/v/v/v) (van Vliet et al. 1991; van Vliet et al. 1996). In all cases a 100 μ L aliquot was injected into the HPLC system.

Marker administration and sampling. Chromic oxide (Cr_2O_3) was used as an external marker for the dry matter digestibility determinations. Animals were administered the marker (15 and 0.65 g d^{-1} for heifers and goats, respectively) during 8 days to generate a steady state marker appearance in the feces. The samples collected on the last three days three days following steady-state were mixed to end up with one sample per animal per period. The Cr_2O_3 quantification was done by atomic absorption spectrophotometry (5500 Perkin-Elmer, Norwalk, CT) with the following parameters: wavelength 357.9, slit width 0.7 and a flame of air-acetylene.

Statistical analyses. Analysis of growth rates and all samples for β -carotene, retinal and retinol concentrations were compared among treatment groups by one-way ANOVA using the general linear model of SAS (SAS 1988). To overcome the problem of unequal variances between treatments, the treatment 0 was eliminated for the analyses of plasma and feces and only means are reported. Data for day 1 of treatments 5.5 and 352 were also deleted from the analysis and only the means are reported.

RESULTS

The initial and final body weights (kg) were 224.5 ± 28.4 and 334.1 ± 28.5 for heifers; and 11.5 ± 3.7 and 20.9 ± 4.43 kg for goats. Mean growth rates of 913 and 78.6 g/d were obtained, for heifers and goats, respectively. β -carotene supplementation did not affect growth rates ($P>0.1$). Means for empty body weights (kg) were 177.7 ± 15.2 (53.18% of body weight) and 10.7 ± 1.97 (51.15% of BW); liver weights (kg) were 4.37 ± 0.26 (1.31% of BW) and 0.35 ± 0.07 (1.67% of BW) for heifers and goats, respectively. None of the variables were affected by treatments ($P>0.1$).

Plasma β -carotene during the washout phase decreased in heifers from 152.34 ± 19.56 nmol/mL to non detectable concentrations; goats never had detectable levels of β -carotene. Retinol concentrations decreased from 45.87 ± 8.37 to 25.78 ± 4.41 and from 51.05 ± 4.89 to 32.38 ± 4.73 nmol/mL in heifers and goats, respectively, indicating that 90 days were not enough to totally deplete the stored vitamin A.

β -carotene and retinol concentrations in plasma are summarized in **Table 2**. The results show that regardless of the treatment, on day one, for neither specie were differences in retinol concentrations detected ($P>0.1$). Goats did not show blood β -carotene, except for days 10 (both doses) and 30 (5.5 dose); on treatments 5.5 and 352, the level of retinol increased on day 10 of supplementation, but decreased after day 20. The level of β -carotene in the plasma of heifers responded directly to the level of β -carotene fed ($P<0.01$).

Table 3 shows changes in the excretion of β -carotene and retinol in dry feces. β -carotene excretion on day 30 in heifers (both treatments) was different from the other days; in goats only day 30 for the 352 dose was different.

In hepatic tissue, β -carotene concentrations were highest with the 352 dose in both species (**Tables 4 and 5**).

In heifers' livers the highest concentration of retinol was observed for treatment 352; however, the concentration for treatment 5.5 was lower than the one for treatment 0 ($P < 0.01$, **Table 4**). In goats the concentration of hepatic retinol increased in response to the level of β -carotene supplemented ($P < 0.01$, **Table 5**). In subcutaneous adipose tissue of heifers, β -carotene deposition occurred only in the 352 level ($P < 0.01$); as for their kidney fat, the deposition of β -carotene was a function of the supplemented level ($P < 0.01$, **Table 4**). In goats the deposition of β -carotene in adipose tissue was not observed (**Table 5**).

Figures 1 and 2 show the results of cleavage activity of 15,15'-dioxygenase in bovines; no interactions between treatments and intestinal portions were found ($P > 0.2$). Across β -carotene levels, results were: 0.192, 0.322 and 0.446 nmol retinal/mg S-9 protein/h ($P < 0.01$) for 0, 5.5 and 352 mg β -carotene, respectively; across intestinal portions results were 0.446, 0.431 and 0.083 ($P < 0.01$) for duodenum, jejunum and ileum, respectively. **Figure 3** shows the caprine data, with an interaction between treatment and intestinal portion ($P < 0.05$); results were for treatment 0: 1.4, 1.404 and 0; for treatment 5.5: 1.406, 1.423 and 0.128; and for treatment 352: 1.464, 1.994 and 0.481 nmol retinal/mg S-9 protein/h for duodenum, jejunum and ileum, respectively.

There were no differences in cleavage activity in the liver of either species ($P > 0.1$, **Table 6**).

The digestibility of the experimental diets was 57.15 ± 0.98 and 61.38 ± 0.83 for heifers and goats, respectively, and was not affected by treatments ($P > 0.1$). The estimate β -carotene digestibilities were for treatment 5.5, 56.62 and 78.75% for heifers and goats, respectively. For treatment 352 were 98.46 and 99.9% for heifers and goats, respectively.

DISCUSSION

Heifers had higher concentrations of β -carotene in blood than goats and higher concentrations than these reported by Yang et al. (1992). The concentration reported by these authors in Herford steers is similar to the one observed in our experiment on day 10 with the 5.5 dose. They did not detect β -carotene in serum in goats or in subcutaneous fat, similar to the results reported here. The difference in results between Yang et al.'s (1992) work and this experiment could be due to the higher levels of β -carotene used, and the fact that we added the compound to the diet, while in Yang et al.'s experiment β -carotene was a component of the pasture fed. The results of β -carotene concentrations in bovine plasma and tissues were higher than these reported by Mora et al. (in press) with Holstein steers and this supports the report by Barton and Pleasants (1993) in relation of the effect of breed in yellow fat.

The data on changes in the plasma concentration of β -carotene during the 30 days of supplementation, show that for the 352 dose (Table 2), as days go by, the concentration increases without reaching a steady-state (similar to the one finding by Mora et al.), which might suggest that β -carotene keeps being absorbed freely. This does not occur in goats, where the plasma concentration was only increased on day 10 and if it is assumed that plasma concentration reflects higher absorption rates, it could be that the animals were initially deficient in vitamin A. As for the excretion of β -carotene (Table 3), it was increased by day 30, which supports the fact that as the dose increases, so does the absorption.

The results obtained for the β -carotene digestibility, too contribute the fact of β -carotene absorption is increase at the supplementation increased as observed in plasma and faeces.

The differences in the intestinal cleavage activity between heifers and goats (1:3) were not observed in hepatic tissue, where the activity was similar, and shows that

the intestine in the most important site in relation to yellow fat production. This can partially explain the differences in pigmenting fat, between ruminant species.

In heifers we did not find interactions for enzyme activity between dose of β -carotene and intestinal section, and the highest activity was observed in duodenum and jejunum, which accounted for 91.31% of the variation in enzyme activity. In contrast, in rats most of the activity has been found in the jejunum (Duszka et al. 1996). The less acidic pH in the duodenum of ruminants could be responsible for the differences between species.

The results observed in **Figures 1** and **3** show that as the quantity of fed β -carotene increases, so does the activity of 15,15'-dioxygenase in both species. Some reports contradict this observation, Villard and Bates (1986) suggested that low tissue vitamin A increased dioxygenase activity in rats. Van Vliet et al. (1992) also demonstrated increased *in vitro* 15,15' dioxygenase activity in intestinal homogenates in vitamin A deficient hamsters. As the vitamin A status of hamsters and rats decreased, 15,15' dioxygenase activity increased, indicated by the increased production of vitamin A from β -carotene. On the same line, Lee et al. (1998), working with gerbils, suggests increased β -carotene absorption when the animals are vitamin A deficient. In the three references cited above, it is mentioned that as the vitamin A status of the animals were lower, they had higher enzymatic activities. However, it is important to consider that our animals, although initially deficient, were supplemented for 30 days with β -carotene so by the time they were slaughtered for the *in vitro* experiment, they had normal levels of plasma retinol and enough liver reserves. Therefore it is possible that the enzyme was previously stimulated by substrate.

Moore et al. (1996), working with rats and gerbils, showed that brush border membrane vesicle uptake of β -carotene was not affected by retinol status. They found that the uptake of β -carotene by the membranes of intestinal cells, using a brush border membrane vesicle model, was decreased when the gerbil became deficient in vitamin A. The fecal recovery of the radio-labeled dose in their studies

suggests an increased β -carotene absorption when gerbils are retinol deficient. Although the uptake of β -carotene into the intestinal mucosal cells is decreased, it is possible that the absorption from the intestinal cells into the lymphatic circulation is increased, resulting in a net increase in β -carotene absorption.

Lederman et al. (1998), working with ferrets, concluded that the *in vivo* conversion of dietary β -carotene to vitamin A and the subsequent accumulation of the latter in tissues occurred less efficiently when retinol status was compromised, which is contrary to observed in rats, hamsters and gerbils.

More studies about the kinetics of the enzyme are needed, specially *in vivo*, to show differences between species (with white or yellow fat), and if such differences exist, the use of this information will be important in understanding the metabolism of β -carotene.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank BASF Mexicana S.A. for the generous donation of the Lucarotin® and to who revised the English of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Association of Official Analytical Chemists. (1990) Official Methods of Analysis, 15th Edn. Arlington : Association of Official Analytical Chemists.
- Barton, R.A. and Pleasants, A.B. (1993) Fat colour and meat colour in different breeds of steers in five consecutive years raised on pasture and slaughtered at 30 months of age. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 53: 389-391
- Bradford, M.M. (1976) A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248

- Duska, C., Grolier, P., Azim, E.M., Gouabau, M.C., Borel, P. and Azais-Braesco, V. (1996) Rat intestinal β -carotene dioxygenase activity is located primarily in the cytosol of mature jejunal enterocytes. *J. Nutr.* 126:2250-2256
- Goodman, D. S. & Huang, H.S. (1965) Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science* 149:879-880
- Hoppe, P.P., Chew, B.P., Safer, A., Stegemann & Biesalski, H.K. (1996) Dietary β -carotene elevates plasma steady-state and tissue concentrations of β -carotene and enhances vitamin A balance in preruminant calves. *J. Nutr.* 126:202-208.
- Lederman, J.D., Overton, K.M., Hofmann, N.E., Moore B.J., Thornton, B. & Erdman J.W. (1998) Ferrets (*Mustela putorius furo*) Inefficiently convert β -carotene to vitamin A. *J. Nutr.* 128:271-279
- Lee, C.M., Lederman, J.D., Hofmann, N.E. & Erdman J.W. (1998) The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) is an appropriate animal model for evaluation of the conversion of β -carotene to vitamin A. *J. Nutr.* 128:280-286
- Moore A.C., Gugger E.T. & Erdman J.W. Jr. (1996) Brush border membrane vesicles from rats and gerbils can be utilized to evaluate the intestinal uptake of all-trans and 9-cis β -carotene. *J. Nutr.* 126:2904-2912
- Mora O., Shimada A., Romano J.L., González-de-Mejia E., Ruiz F.J. & Gómez R. Presence of fed β -carotene in digesta and tissues of Holstein steers. *Australian J. Agric. Res.* Submitted.
- National Research Council (1996) Nutrient Requirements of Beef Cattle. National Academy Press, Washington, D.C.
- Olson, J.A. & Hayaishi, O. (1965) The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54:1364-1370
- Statistical Analysis System (1988). SAS/STAT User's Guide : Release 6.03 Edition. Cary, NC. SAS Institute.

- Strachan, D., Yang, A., and Dillon, R. (1993) Effect of grain feeding on fat colour and other carcass characteristics in previously grass-fed *Bos indicus* steers. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 33: 269-273.
- Villard, L. and Bates, C. J. (1986) Carotene dioxygenase (EC. 1.13.11.21) activity in rat intestine: effects of vitamin A deficiency and of pregnancy. *Br. J. Nutr.* 56: 115-122.
- Vliet T. van, Schaik F van. & van den Berg H. (1992) Beta-carotene metabolism: the enzymatic cleavage to retinal. *Neth. J. Nutr.* 53:186-190
- Vliet T. van, Schaik F. van, van den Berg H. & Schreurs H.P. (1993) Effect of vitamin A and β -carotene intake on dioxygenase activity in rat intestine. *Annals of the New York Academy of Science* 691:220-222
- Vliet T. van, Schaik F. van, Schoonhoven, J. & Schrijver, J. (1991) Determination of several retinoids, carotenoids and E vitamins by high-performance liquid chromatography. Application to plasma and tissues of rats fed a diet rich in either β -carotene or canthaxanthin. *J. Chromatogr.* 513: 179-186.
- Vliet T. van, Vlissingen M. van, Schaik F. van & van den Berg H. (1996) β -carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. *J. Nutr.* 126: 499-508.
- Yang A., Larsen T.W & Tume R. K. (1992) Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Aus. J. Agric. Res.* 43:1809-1817.
- Yang A., McLennan S.R., Armstrong J., Larsen T.W., Shaw F.D. and Tume R. (1993) Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. *Aust. J. Agri. Res.* 44:215-220

TABLE 1
Composition of the basal diets¹

Ingredient	Heifers	Goats
	kg/mT	
Sorghum grain	415	421
Sorghum straw	397	353
Sugarcane molasses	122.1	122.1
Meat meal	40	75
Urea	10	13
NaCl	8	8
Animal fat	3.5	3.5
Mineral premix	3	3
Calcium orthophosphate	1.4	1.4

¹ Laboratory analyses indicated that the heifers' diet had 89.5% DM, 11.9% CP, 9.26 µg β-carotene kg·DM⁻¹ (17.24 nmol·kg DM⁻¹) and 10.22 µg retinol·kg DM⁻¹ (35.67 nmol·kgDM⁻¹) and ME calculated at 2.29 Mcal·kg DM⁻¹.

The goats' diet contained 86.7% DM, 13.9% CP, 8.86 µg β-carotene·kg DM⁻¹ (16.51 nmol·kg DM⁻¹) and 10.77 µg retinol kg·DM⁻¹ (35.58 nmol·kgDM⁻¹) and ME calculated at 2.33 Mcal·kg DM⁻¹

TABLE 2

Plasma β -carotene (β C) and retinol in heifers and goats fed different levels of β -carotene for 30 days¹

mg β C	Day	β -carotene, nmol/mL		Retinol, nmol/mL	
		Heifers ²	Goats ³	Heifers ⁴	Goats ⁵
0	1	ND	ND	24.26	30.84
	10	ND	ND	33.12	24.35
	20	ND	ND	29.83	26.90
	30	ND	ND	22.46	22.15
5.5	1	ND	ND	26.83	40.08
	10	11.48 ^d	1.21 ^{bc}	49.68 ^b	60.51 ^c
	20	39.33 ^d	ND ^a	35.66 ^a	41.62 ^{ab}
	30	28.90 ^d	0.43 ^{ab}	38.11 ^a	37.77 ^{ab}
352	1	ND	ND	22.21	21.47
	10	109.03 ^e	1.99 ^{bc}	56.22 ^b	57.86 ^c
	20	198.89 ^f	ND ^a	49.97 ^b	60.60 ^c
	30	314.08 ^g	ND ^a	31.67 ^a	51.88 ^{bc}

¹ Values are means. Within a column, values with different superscripts are significantly different: a, b and c ($P < 0.05$); d, e, f and g ($P < 0.01$). ND= no detectable

² n=4 SEM=15.12

³ n=5 SEM=0.40

⁴ n=4 SEM=3.80

⁵ n=5 SEM=4.46

TABLE 3

β -carotene and retinol contents of dry feces from heifers and goats fed different levels of β -carotene for 30 days¹

mg β C	Day	β -carotene, nmol/g		Retinol, nmol/g	
		Heifers ²	Goats ³	Heifers ⁴	Goats ⁵
0	1	0.28	0.81	0.08	ND
	10	0.47	0.58	ND	ND
	20	0.35	0.51	ND	0.61
	30	0.33	0.21	1.23	0.93
5.5	1	4.29	2.03	ND	ND
	10	9.72 ^a	5.93 ^a	0.31 ^a	0.64 ^a
	20	9.72 ^a	6.67 ^a	3.78 ^a	1.20 ^a
	30	181.31 ^c	7.58 ^a	20.53 ^{ab}	86.13 ^a
352	1	3.93	2.64	1.72	0.08
	10	5.91 ^a	6.53 ^a	13.47 ^{ab}	52.62 ^a
	20	11.23 ^a	7.75 ^a	73.01 ^c	130.12 ^a
	30	73.36 ^b	87.58 ^b	237.85 ^b	531.74 ^b

¹ Values are means. Within a column, values with different superscripts are significantly different. ND=Not detectable.

² n=4 SEM=24.01, P<0.01

³ n=5 SEM=9.23, P<0.01

⁴ n=4 SEM=41.90, P<0.01

⁵ n=5 SEM=41.50, P<0.05

TABLE 4

Effect of β -carotene fed to heifers on β -carotene (β C) and retinol (ROH) concentrations in tissues, nmol/g¹

mg β C kg MS ⁻¹	0		5.5		352		SEM	
Tissue	β C	ROH	β C	ROH	β C	ROH	β C	ROH
Liver	1.25 ^a	205.85 ^a	1.31 ^a	64.95 ^b	78.97 ^b	1136.31 ^c	2.08	29.55
Subcutaneous fat	ND ^a	5.03	ND ^a	8.49	13.82 ^b	16.16	1.75	2.85
Kidney fat	ND ^a	3.06 ^x	0.36 ^a	6.97 ^x	1.22 ^b	11.02 ^y	0.21	2.56

¹ Values are means, n=4. Within a column, values with different superscripts are significantly different: a, b (P<0.01); x,y (P<0.05). ND=Not detectable.

TABLE 5
 Effect of β -carotene (β C) fed to goats on β -carotene and retinol (ROH)
 concentrations in tissues, nmol/g¹

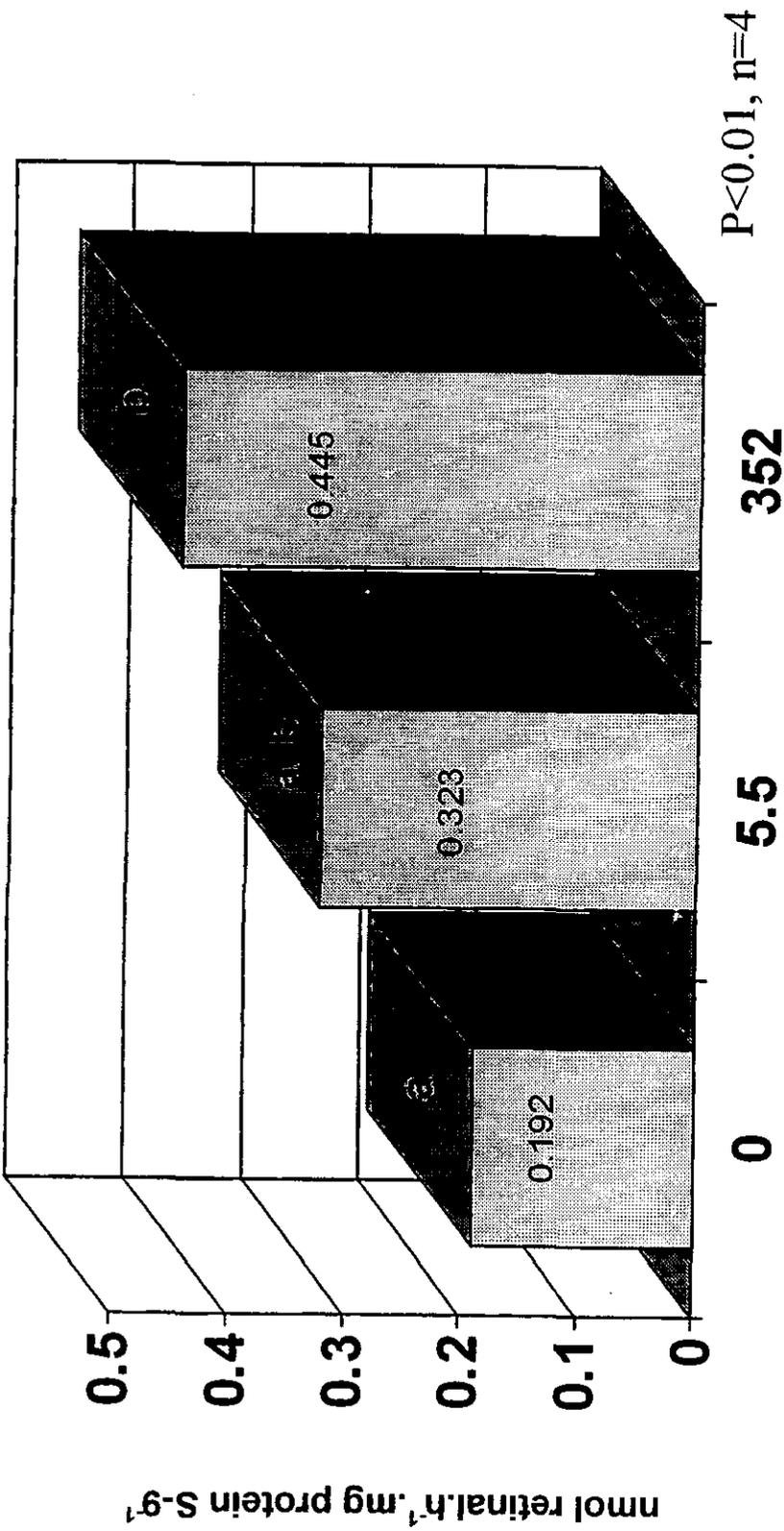
mg β C kg MS ⁻¹	0		5.5		352		SEM	
Tissue	β C	ROH	β C	ROH	β C	ROH	β C	ROH
Liver	ND ^a	160.21 ^a	ND ^a	235.67 ^a	0.42 ^b	513.62 ^b	0.11	63.21
Subcutaneous								
fat	ND	ND ^a	ND	2.42 ^a	ND	9.48 ^b		1.23
Kidney								
fat	ND	ND ^a	ND	1.96 ^a	ND	11.69 ^b		3.6

¹ Values are means, n=5. Within a column, values with different superscripts are significantly different: a, b (P<0.01). ND=Not detectable.

TABLE 6

Effect of fed β -carotene on cleavage activity of 15,15'dioxygenase in the liver of heifers and goats, nmol retinal \cdot h⁻¹ \cdot mg protein S⁻¹

mg β -carotene fed	Heifers		Goats	
0	37.89	0.13	38.12	0.27
5.5	38.02	0.16	38.59	0.24
352	38.27	0.16	38.68	0.24



mg β -carotene/kg dry matter intake

FIGURE 1. Effect fed β -carotene on cleavage activity in the intestine of Angus heifers

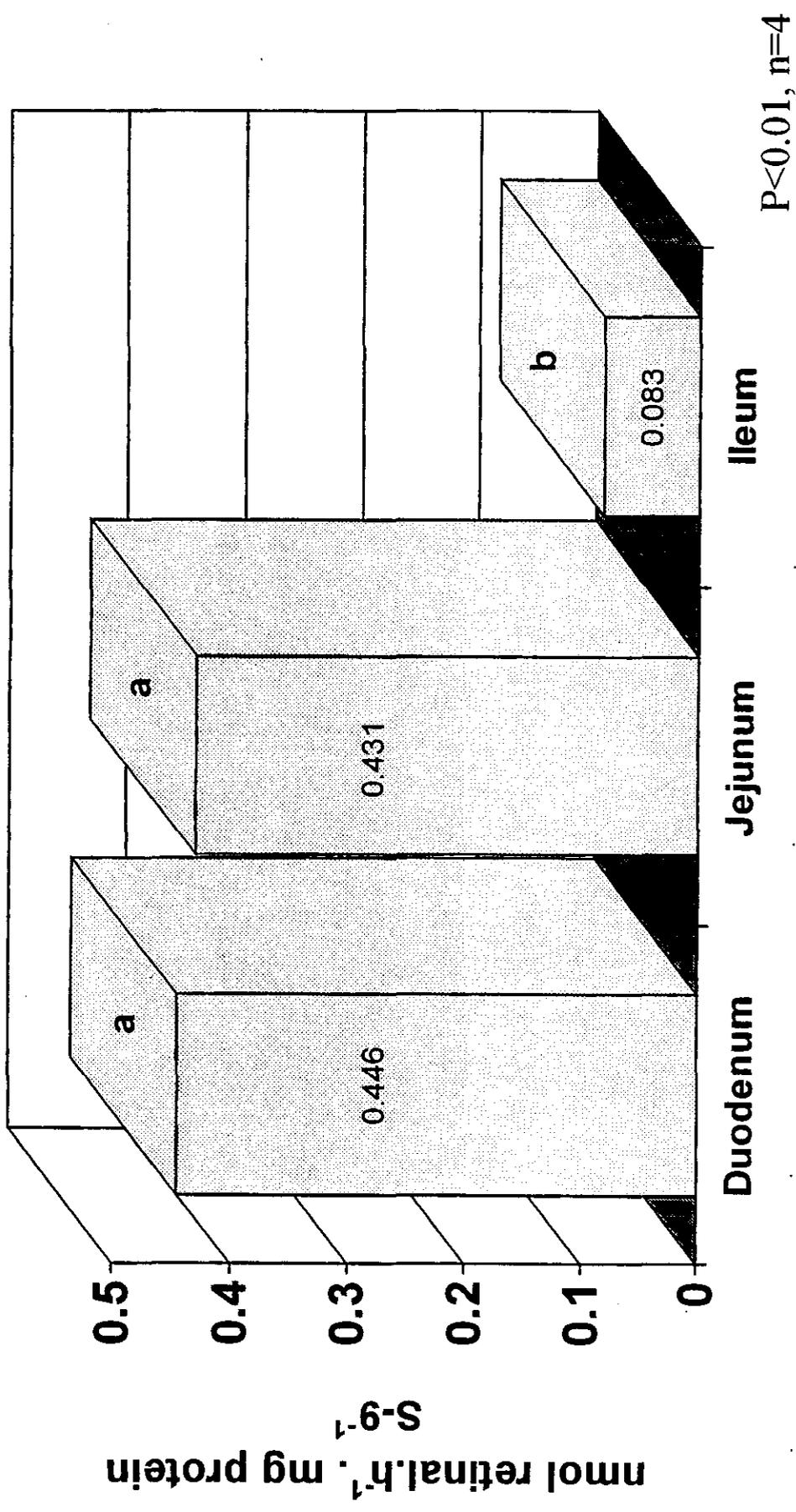
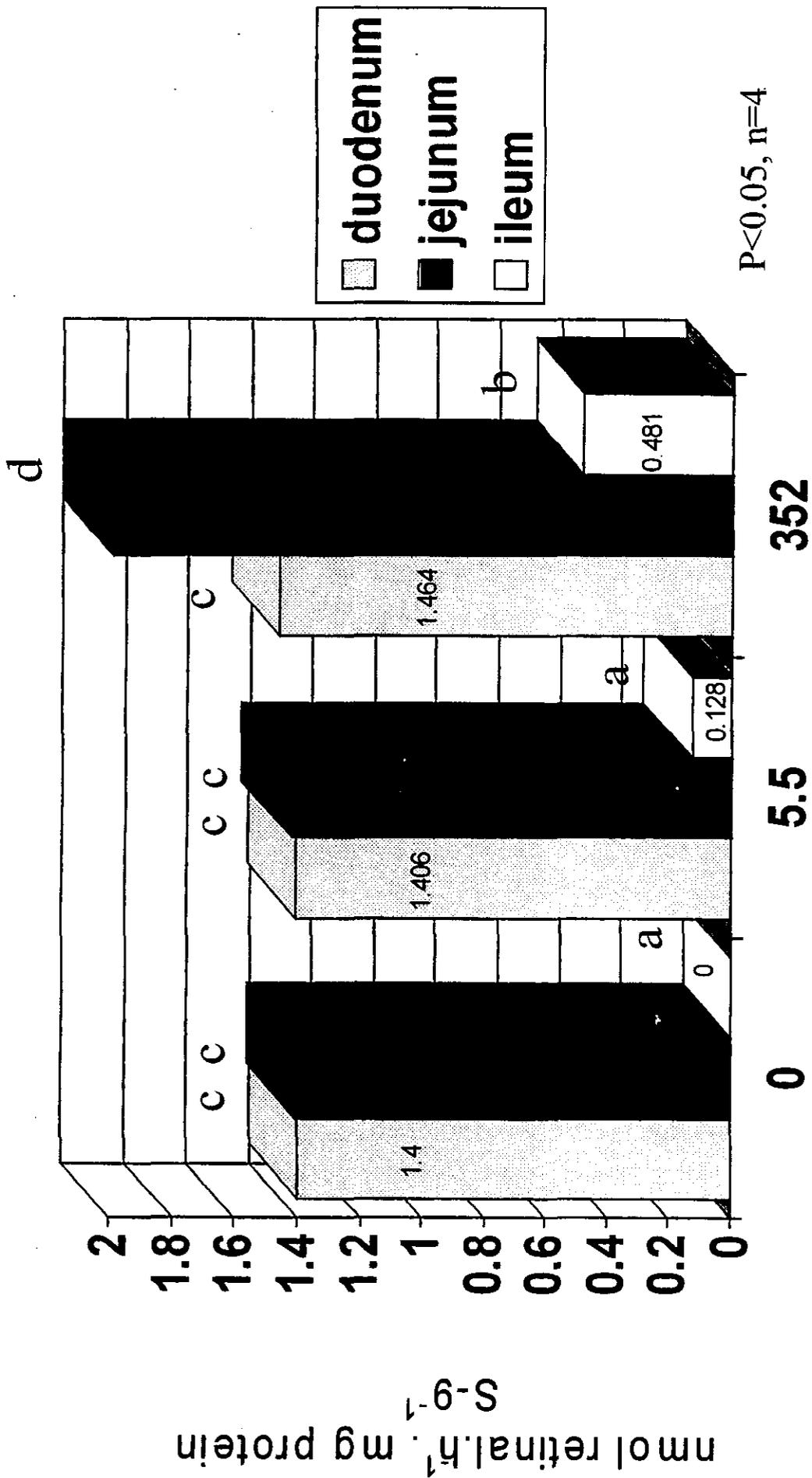


FIGURE 2. Effect of small intestine section on β -carotene cleavage activity in Angus heifers



mg β -carotene/kg dry matter intake

FIGURE 3. β -carotene cleavage activity in the intestine of goats

VIII. DISCUSION GENERAL

En el caso de la primera etapa de ésta investigación se obtuvo una menor desaparición por el método *in vitro* para β -caroteno en ambas especies, 0.13 y $0.37\% \cdot h^{-1}$ y para carotenos totales de 0.20 y $0.62\% \cdot h^{-1}$ para novillos y cabras respectivamente, que la reportada en la literatura.

King et al. (1962) encontraron pérdidas de éste compuesto de 27.3% a las 9 horas de incubación, lo que representaría $3.03\% \cdot h^{-1}$, y Keating et al. (1964) obtuvieron pérdidas de 34.4% a las 16 horas de incubación, lo que significa que la k_d es de $2.25\% \cdot h^{-1}$, es decir, los resultados obtenidos por estos investigadores son entre 1000 y 1500% mayores a los obtenidos en este estudio.

Las degradaciones tan altas reportadas por estos autores, hizo pensar que el β -caroteno estaba siendo destruido a nivel ruminal y se atribuyó ésta destrucción a los microorganismos ruminales (Westendorf et al. 1990). En este mismo sentido, Van Soest (1994) señala que los carotenoides tienen una digestibilidad del 0.1% a nivel ruminal (en forma de una hidrogenación destructiva), pero que estos compuestos son muy poco utilizados a nivel ruminal. Con la información obtenida en este estudio, se pueden atribuir más las altas k_d a la degradación que sufren los carotenoides debido a la luz y/o a la temperatura durante el análisis, tal como lo reportan Schmitz et al. (1993), que a la acción de la microflora ruminal.

En el método *in situ* las tasas de degradación de β -caroteno y carotenos totales fueron 2.5 , 1.2 , 2.2 y $1.0\% \cdot h^{-1}$ para novillos y cabras, respectivamente. A diferencia King et al. (1962) reportaron pérdidas *in vivo* de 40% de β -caroteno en rumen a las 12 horas, independientemente de su paso al intestino delgado, y en éste estudio se encontraron pérdidas entre las 8 y 16 horas de 10.52 y 10.56% , muy por debajo de lo reportado.

Es posible que la desaparición *in situ* de este compuesto esté asociada a la desaparición del contenido celular o de la materia seca, es decir, desaparecen

por la sola desaparición de la materia seca (digestibilidad y paso al intestino delgado) y no que por degradación *per se*. La comparación de las kd de β C y materia seca reveló resultados muy similares (89%, $P < 0.01$), lo que apoya esta suposición.

Con base en estos resultados, se puede concluir que aparentemente el rumen no es la causa de que existan especies de rumiantes que pigmenten o no la grasa, es decir, la degradación de carotenoides a nivel ruminal es baja tanto en bovinos como en caprinos, de tal forma que grandes cantidades de estos compuestos pasan intactos al intestino delgado.

En la segunda etapa de éste estudio se obtuvieron, utilizando una dosis de β -caroteno parecida a lo que consumiría un animal en pastoreo ($352 \text{ mg} \cdot \text{kg MS}^{-1}$), resultados similares a los reportados por Yang et al. (1992) con animales en pastoreo en cuanto al depósito de β -caroteno y retinol en hígado y tejido adiposo.

En este estudio se observó un incremento lineal en las concentraciones de β -caroteno en rumen, duodeno y heces a través de los días de suplementación, similar a lo que encontraron Yang et al. (1993).

Sin embargo, la relación entre las concentraciones de β -caroteno encontradas en rumen, duodeno y heces y los días de suplementación tiende a mantenerse entre tratamientos, pero dicha relación es menor en el caso de las heces (1.05 , $P > 0.01$). Lo anterior puede ser un indicativo de que a mayor dosis de β -caroteno en la dieta mayor absorción de este compuesto a nivel intestinal.

La digestibilidad de β -caroteno se vió incrementada por el nivel de este compuesto en la dieta (66.25, 84.39 y 88.14% para los tratamientos 5.5, 44 y 352, respectivamente), lo que reafirma que en los bovinos β -caroteno puede ser absorbido en función de su concentración en el alimento y que los días de suplementación con este compuesto no afectan la absorción.

Los resultados reportados por Hope et al. (1996), señalan que después de 28 días de suplementación con β -caroteno que en becerros Holstein, β -caroteno alcanza una meseta en el plasma, situación que no se observó en los novillos

Holstein de este estudio, lo que puede estar en función de la edad de los animales (e.g. cantidad de grasa corporal).

Las concentraciones de retinol en suero, en todos los casos donde se recibió β -caroteno en la dieta, tendieron a estabilizarse después del día 20 de suplementación, lo que podría indicar la saturación de la enzima 15,15'dioxigenasa, es decir β -caroteno sigue absorbiéndose independientemente de los días de suplementación, pero la formación de retinol tiene un límite, lo que permite que cada vez haya más β -caroteno circulando en la sangre.

Las concentraciones de retinol en hígado, muestran que la deposición de retinol en este tejido es afectada por la cantidad de β -caroteno ingerido.

En la tercera etapa de este estudio se observó que los bovinos tenían concentraciones de β -caroteno, en plasma, hígado y tejido adiposo, superiores a las encontradas en caprinos, similar a lo reportado por Yang et al. (1992). Además comparando éstos resultados con los de la segunda etapa, se observa que el ganado Angus tiene una mayor predisposición a depositar β -caroteno en el tejido adiposo que los novillos Holstein, lo cual corrobora lo reportado por Barton y Pleasants (1993).

Al igual que en la segunda etapa, en los bovinos se encontró que la excreción de β -caroteno tiende a incrementarse con los días de suplementación, pero la relación entre los días de suplementación es igual entre tratamientos.

Los caprinos mostraron el mismo comportamiento, es decir, en ambas especies se incrementa la absorción, sin embargo en caprinos solo se observaron niveles de β -caroteno circulante para el tratamiento 5.5 en los días 10 y 30 y para el tratamiento 352 en el día 10, lo que significa que prácticamente todo el β -caroteno absorbido es convertido en retinol.

La digestibilidad de β -caroteno se incrementa con la dosis de β -caroteno consumida, lo que contribuye al aumento de absorción de dicho compuesto.

En los bovinos, contrario a lo observado en cabras, la concentración de β -caroteno en plasma se incrementó en función del β -caroteno ingerido y de la misma forma que en la segunda etapa no se observó una meseta.

Los resultados obtenidos en ambas especies muestran que bajo las mismas condiciones, la actividad de la enzima a nivel intestinal, expresada como *retinal formado por mg de la fracción protéica S-9* (van Vliet et al. 1996) es mucho mayor en caprinos que en bovinos (casi 400%); sin embargo, en el hígado la actividad de dicha enzima es muy parecida entre ambas especies.

En cuanto a la porción de intestino delgado con mayor actividad de dicha enzima se observa que a diferencia de animales no rumiantes, donde se reporta que la mayor actividad se localiza en el yeyuno (Duszka et al. 1996), en los bovinos el duodeno y el yeyuno poseen juntos el 91.31% de la actividad. El pH menos ácido del duodeno en los rumiantes, a diferencia del pH más ácido en no rumiantes, podría ser el responsable de estas diferencias.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la actividad de la enzima 15,15'-dioxigenasa se incrementa por la presencia del sustrato.

Contrario a esto, Villard y Bates (1986) encontraron que en ratas con un bajo nivel hepático de vitamina A, se incrementa la actividad de la enzima. Van Vliet et al. (1992) demostraron un incremento de la actividad enzimática en hamsters deficientes en vitamina A.

Moore et al. (1996) sugieren que existe un incremento en la absorción de β -caroteno en gerbos deficientes en vitamina A (especie que si pigmenta la grasa). No es conveniente establecer diferencias entre estos resultados y los encontrados en este estudio, debido a que al realizar el estudio enzimático en este estudio, los animales no eran deficientes en vitamina A.

Es necesario realizar más estudios de la cinética de la enzima 15,15'-dioxigenasa, sobre todo *in vivo*, ya que aun cuando *in vitro* en otros reportes se observa que cuando el hígado tiene niveles altos de vitamina A, la enzima a nivel intestinal tiene una actividad más baja, esto no es necesariamente

cierto *in vivo*, tal como lo demuestran los trabajos de Ribaya et al. (1989), donde aun después de varios días de administrar dosis altas de β -caroteno (20 mg/kg PV) en ratas no se encontró β -caroteno ni en hígado ni en tejido adiposo, lo cual podría estar indicando que tal vez las concentraciones de vitamina A no determinan la actividad enzimática (es decir, no es inhibida por su producto) y aunado a los resultados obtenidos en este trabajo, podría pensarse que tal vez esta enzima no tiene la misma cinética en todas las especies.

Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a explicar en gran medida las diferencias en la pigmentación de la grasa entre especies rumiantes, ya que una vez desechado el rumen-retículo (y por lo tanto los microorganismos ruminales) como primer causa de pigmentación de grasa, queda el intestino delgado como principal fuente de diferencias entre especies.

El intestino permite que la absorción de β -caroteno se mantenga prácticamente constante, independientemente de la dosis consumida y de los días de suplementación) en las 2 especies de rumiantes estudiadas; sin embargo, la enzima 15,15'-dioxigenasa presenta menor actividad en bovinos que en caprinos y además se satura su capacidad de convertir β -caroteno en retinol, permitiendo con ello el depósito de β -caroteno en el tejido adiposo.

IX. CONCLUSIONES

La tasa de desaparición de β -caroteno a nivel ruminal está asociada a la tasa de desaparición de la materia seca y del contenido celular.

No se observaron diferencias entre bovinos y caprinos que permitan suponer que en el rumen-retículo se determina, el que una especie pigmente la grasa y otra no.

Con base en los resultados obtenidos, se puede descartar al rumen-retículo como un lugar en el que exista una alta degradación (utilización por los microorganismos ruminales) de β -caroteno.

El intestino posee una amplia capacidad de absorción de β -caroteno, períodos de suplementación de 30 días con dosis de 352 mg β -caroteno-kg MS⁻¹ no fueron suficientes para limitar o saturar la absorción a este nivel. Aunado a esto, la digestibilidad de β -caroteno se incrementó en función del nivel de β -caroteno en la dieta, lo que contribuye a explicar el aumento en la absorción.

Los tejidos hepático y adiposo, poseen una capacidad limitada de almacenamiento de retinol.

La deposición de β -caroteno en el tejido adiposo subcutáneo de los bovinos se incrementó en función del contenido de β -caroteno en la dieta.

En el intestino delgado de las cabras se observó una mayor actividad de la enzima 15,15'-dioxigenasa (4 a 5 veces mayor) comparada con la de bovinos, lo que podría estar explicando las diferencias en la coloración de la grasa entre ambas especies.

Los mecanismos por los cuales β -caroteno se deposita en el tejido adiposo de ciertas especies no están completamente dilucidados. Es necesario realizar estudios que permitan esclarecer la cinética de la enzima 15,15'-dioxigenasa, así como conocer el transporte y recambio de β -caroteno en las especies de grasa blanca y amarilla. Con ello se podrá comprender el metabolismo de β -caroteno y

proponer en un futuro medidas que permitan inhibir el depósito de β -caroteno en el tejido adiposo del ganado bovino finalizado en pastoreo.

X. LITERATURA CITADA

- Barton, R. A. and Pleasants, A. B. 1993. Fat colour and meat colour in different breeds of steers in five consecutive years raised on pasture and slaughtered at 30 months of age. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 53: 389-391
- Bendich, A. 1989. Carotenoids and the immune response. J. Nutr. 119: 112-115.
- Bendich, A. and Olson, J. 1989. Biological actions of carotenoids. FASEB J. 3: 1927-1932.
- Cartwright, L. A. 1991. Adipose cellularity in *Gallus domesticus*: Investigations to control body composition in growing chickens. J. Nutr. 21: 1486-1497.
- Craft, N. E. 1992. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. J. Agric. Food. Chem. 40: 431-434.
- Duska, C., Grolier, P., Azim, E. M., Gouabau, M. C., Borel, P. and Azais-Braesco, V. 1996. Rat intestinal β -carotene dioxygenase activity is located primarily in the cytosol of mature jejunal enterocytes. J. Nutr. 126: 2250-2256
- Ellis, W. C., Matis, J. H. and Lascano, C. 1979. Quantitating ruminal turnover. Fed. Proc. 38: 2702.
- Emery, R. 1980. Mobilization, turnover and disposition of adipose tissue lipids. In: Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Edited by: Ruckebusch, Y. and Thivend, P. Avi Publishing Company. U.S.A.
- Forrest, R. J. 1981. Effect of high concentrate feeding on the carcass quality and fat coloration of grass-reared steers. Can. J. Anim. Sci. 61: 575-580.
- Frandsen, R. 1986. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. 4a. edición. Interamericana-McGraw Hill. México.
- Glover, J. 1960. The conversion of beta-carotene into vitamin A. Vitam. Horm. 18: 371-386.
- Goodman, D. S., Huang, H. S., Kanai, M. and Shiratori, T. 1967. The enzymatic conversion of all-trans β -carotene into retinal. J. Biol. Chem. 242: 3543-3554.

- Goodman, D. S. and Huang, H. S. 1965. Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. Science 149: 879-880.
- Gross, J. 1991. Pigments in vegetables. Avi Publishing Company. U.S.A.
- Grownowska-Senger, A. and Wolf, G. 1970. Effect of dietary protein on the enzyme from rat and human intestine which converts beta-carotene into vitamin A. J. Nutr. 100: 300-308.
- Guyton, A. 1984. Tratado de Fisiología Médica. 6a. edición. Nueva Editorial Interamericana. México.
- IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry). 1975. Nomenclature of carotenoids. Pure Appl. Chem. 41 : 407
- Keating, E., Hale, W. and Hubbert, F. 1967. *In vitro* degradation of vitamin A and carotene by rumen liquor. J. Anim. Sci. 25: 849.
- King, T. B., Lohman, T. and Smith, G. S. 1962. Evidence of rumen-reticular losses of vitamin A and carotene. J. Anim. Sci. 21: 1002.
- Klatte, F. J. 1964. Ph. D. Dissertation. Univ. of Kentucky, Lexington. U.S.A.
- Knight, T., Ridland, M., Hill, F., Death, A. and Wyeth, T. 1993. Effects of stress and nutritional changes on the ranking of cattle on plasma carotene concentrations. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 53: 455-456.
- Leclercq, A. 1984. Adipose tissue metabolism and its control in birds. Poultry Sci. 63: 2044-2054.
- Lehninger, A. Bioquímica. 1984. Segunda edición. Ediciones Omega. España.
- Moore, T. V. 1930. The absence of the liver oil vitamin A from carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A *in vivo*. Biochem. J. 24: 692-698.
- Olson, J. 1989. Provitamin A function of carotenoids: The conversion of β carotene into vitamin A. J. Nutr. 119: 105-108.
- Olson, J.A. and Hayaishi, O. 1965. The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. 54: 1364-1369.

- Parker, R. S. 1989. Carotenoids in human blood and tissues. J. Nutr. 119: 101-104.
- Pollack, J., Campbell, J., Potter, S. and Erdman, J. 1994. Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) absorb β -carotene intact from a test meal. J. Nutr. 124: 869-873.
- Poor, C., Bier, T., Merchen, N., Fahey, G., Murphy, M. and Erdman, J. 1992. Evaluation of the preruminant calf as a model for the study of human carotenoid metabolism. J. Nutr. 122:262-268.
- Poore, M. H., Moore, J. A. and Swingle, R. S. 1990. Differential passage rates and digestion of neutral detergent fiber from grain and forages in 30, 60 and 90% concentrate diets fed to steers. J. Anim. Sci. 68: 2965.
- Ribaya, M. J., Holmgren, S. C., Fox, J. G. and Russell, R. M. 1989. Dietary β -carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. J. Nutr. 119: 665-668.
- Ribaya, M. J., Jox, J. G., Rosenblad, W. D., Blanco, M. and Russell, R. 1992. β -carotene, retinol and retinyl ester concentrations in serum and selected tissues of ferrets fed β -carotene. J. Nutr. 122: 1898-1903.
- Schiedt, K. 1988. The significance of carotenoids in animal nutrition. Roche Symposium. The value of vitamins in animal nutrition. London.
- Schmitz, H. H., Poor, C. L., Gugger, E. T. and Erdman, J. W. 1993. Analysis of carotenoids in human and animal tissues. Methods in Enzymology, 24: 102-116.
- Serrano, I. 1993. Comparación de 2 fuentes de pigmentos silvestres y uno comercial proveniente de *Tagetes erecta* en la pigmentación de la yema de huevo en trópico seco. Facultad de Agronomía. Universidad de Guadalajara. México.
- Shorland, F. B., Weenink, R. O., Jhons, A. T. and McDonald, I. R. 1957. The effect of sheep-rumen contents on unsaturated fatty acids. Biochem. J. 67:328.
- Simpson, K. L. and Chichester, C. O. 1981. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. Annu. Rev. Nutr. 1: 351.

- Strachan, D., Yang, A., and Dillon, R. 1993. Effect of grain feeding on fat colour and other carcass characteristics in previously grass-fed *Bos indicus* steers. Austr. J. Exp. Agric. 33: 269-273.
- Tee, S. E. 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 31(1/2): 103-163.
- Trenkle, A. and Marple, D. N. 1983. Growth and development of meat animals. J. Anim. Sci. 57 (Suppl.2).
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Second edition. Comstock Publishing, Associates of a division of Cornell University Press. New York, U.S.A.
- van Vliet T., van Schaik F. and van Den Berg H. 1992. Beta-carotene metabolism: the enzymatic cleavage to retinal. Neth. J. Nutr. 53:186-190.
- van Vliet T., van Vlissingen M., van Schaik F. and van den Berg H. 1996. β -carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. J. Nutr. 126: 499-508.
- Villard, L. and Bates, C. J. 1986. Carotene dioxygenase (EC. 1.13.11.21) activity in rat intestine: effects of vitamin A deficiency and of pregnancy. Br. J. Nutr. 56: 115-122.
- Westendorf, M., Mitchell, G., Gay, N., Tucker, R. and Bradley, N. 1990. Plasma vitamin A levels in cattle in response to large doses of vitamin A. Internat. J. Nutr. Res. 60:314-319.
- White, W., Peck, K., Ulman, E. and Erdman, J. 1993. The ferret as a model for evaluation of the bioavailabilities for all-trans- β -carotene and its isomers. J. Nutr. 123: 1129-1139.
- WHO (World Health Organization). 1976. Vitamin A Deficiency and Xerophthalmia. Tech. Rep. Ser. No. 590. Geneva.
- Yang A., Larsen T.W and Tume R. K. 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. Aust. J. Agric. Res. 43:1809-1817.

- Yang, A., McLennan, S., Armstrong, J., Larsen, T., Shaw, F. and Tume, K. 1993. Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. Aust. J. Agric. Res. 44: 215-220.
- Zhou, G. H., Yang, A. and Tume, R. K. 1993. A relationship between bovine fat colour and fatty acid composition. Meat Sci. 35: 205-212.

ANEXOS

Anexo 1. Gráficas complementarias al Estudio "In vitro and in situ disappearance of β -carotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay, in bovine and caprine ruminal fluids"

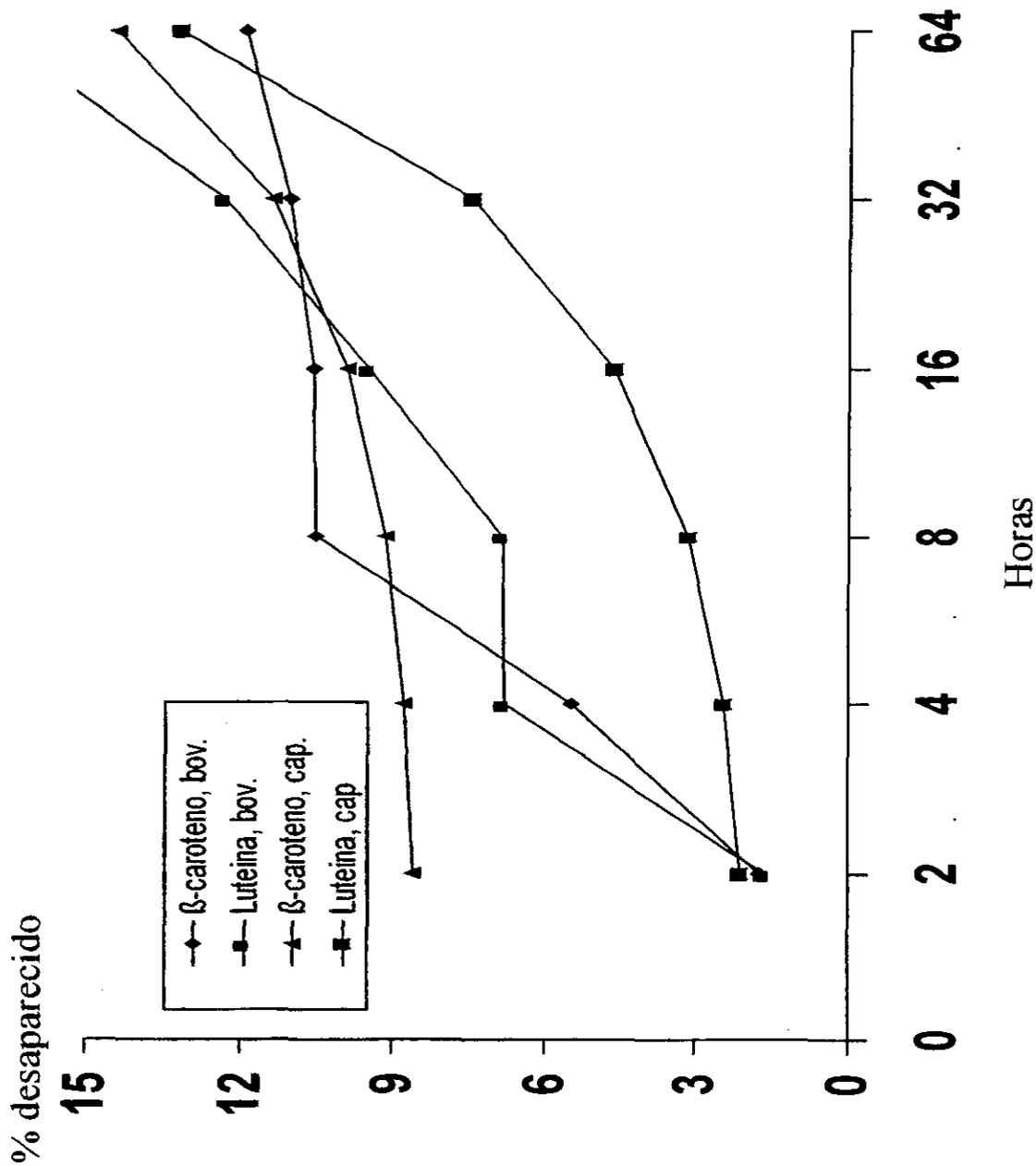


Figura 1. Desaparición *in vitro* de β -caroteno y luteína, en bovinos y caprinos

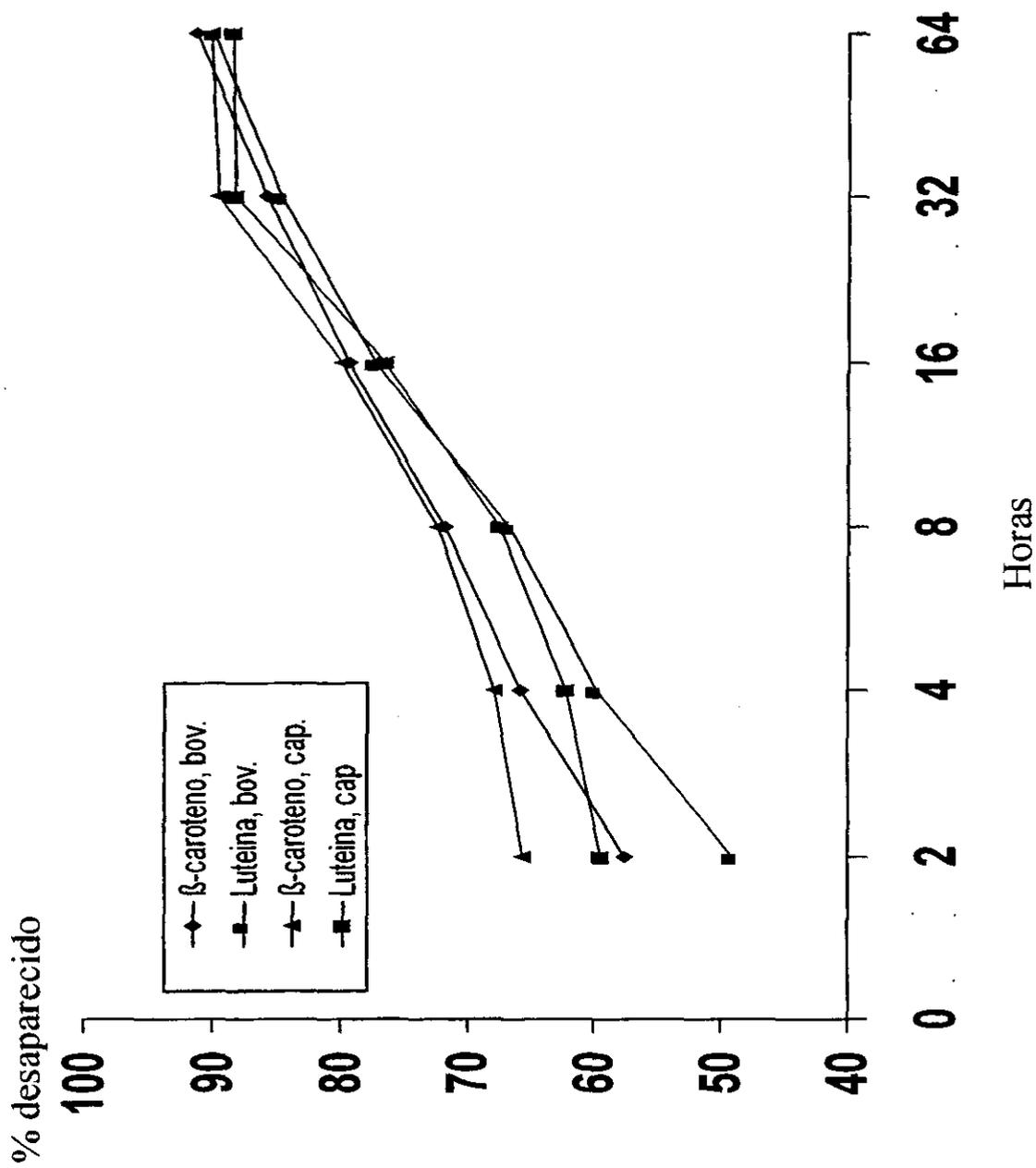


Figura 2. Desaparición *in situ* de β-caroteno y luteína, en bovinos y caprinos

Anexo 2. Gráficas complementarias al Estudio "Intestinal Absorption of β -carotene and Cleavage Activity of 15,15' dioxygenase in Cattle and Goats"

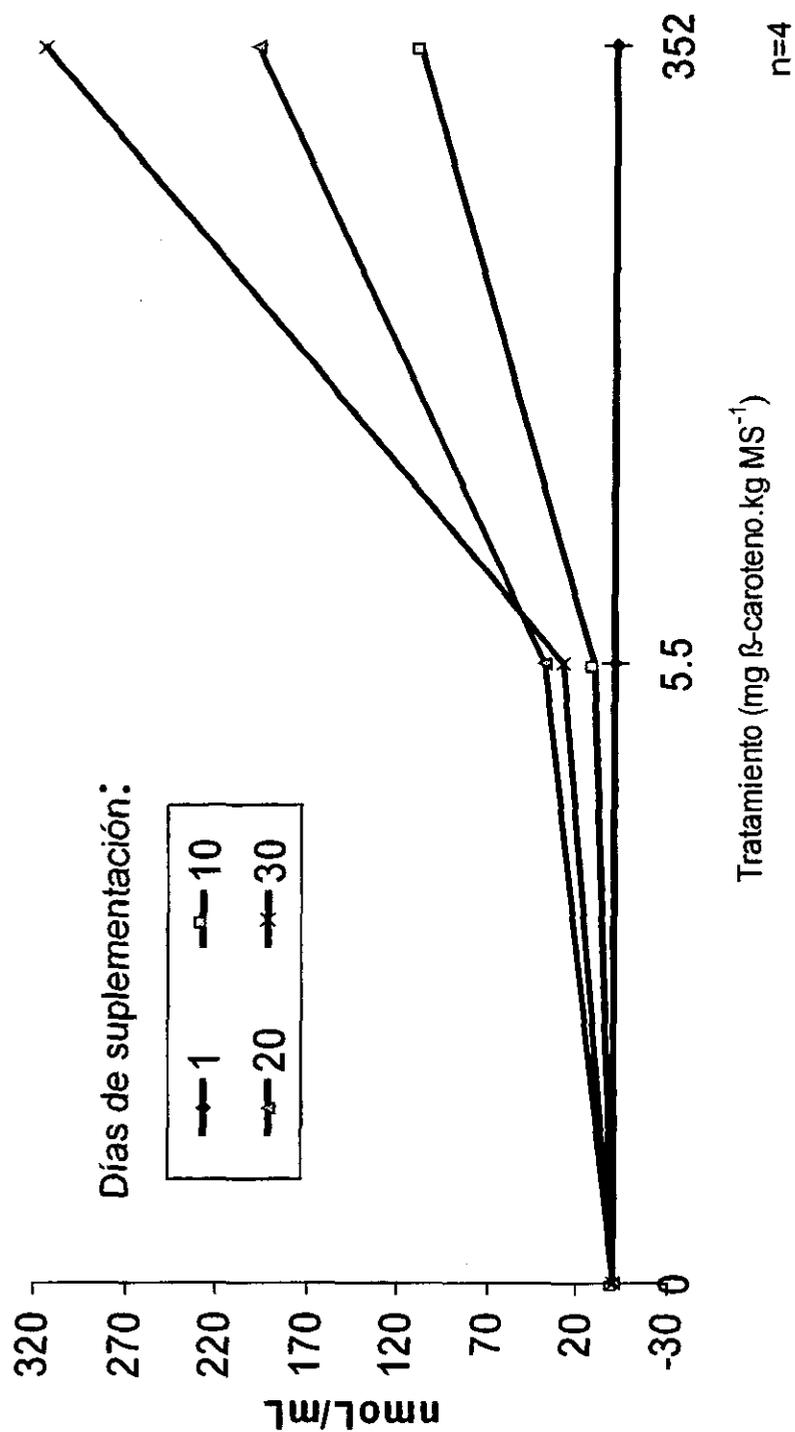


Figura 1. Efecto del nivel y los días de suplementación de β -caroteno en la dieta, sobre la concentración de β -caroteno en el plasma de vaquillas Angus.

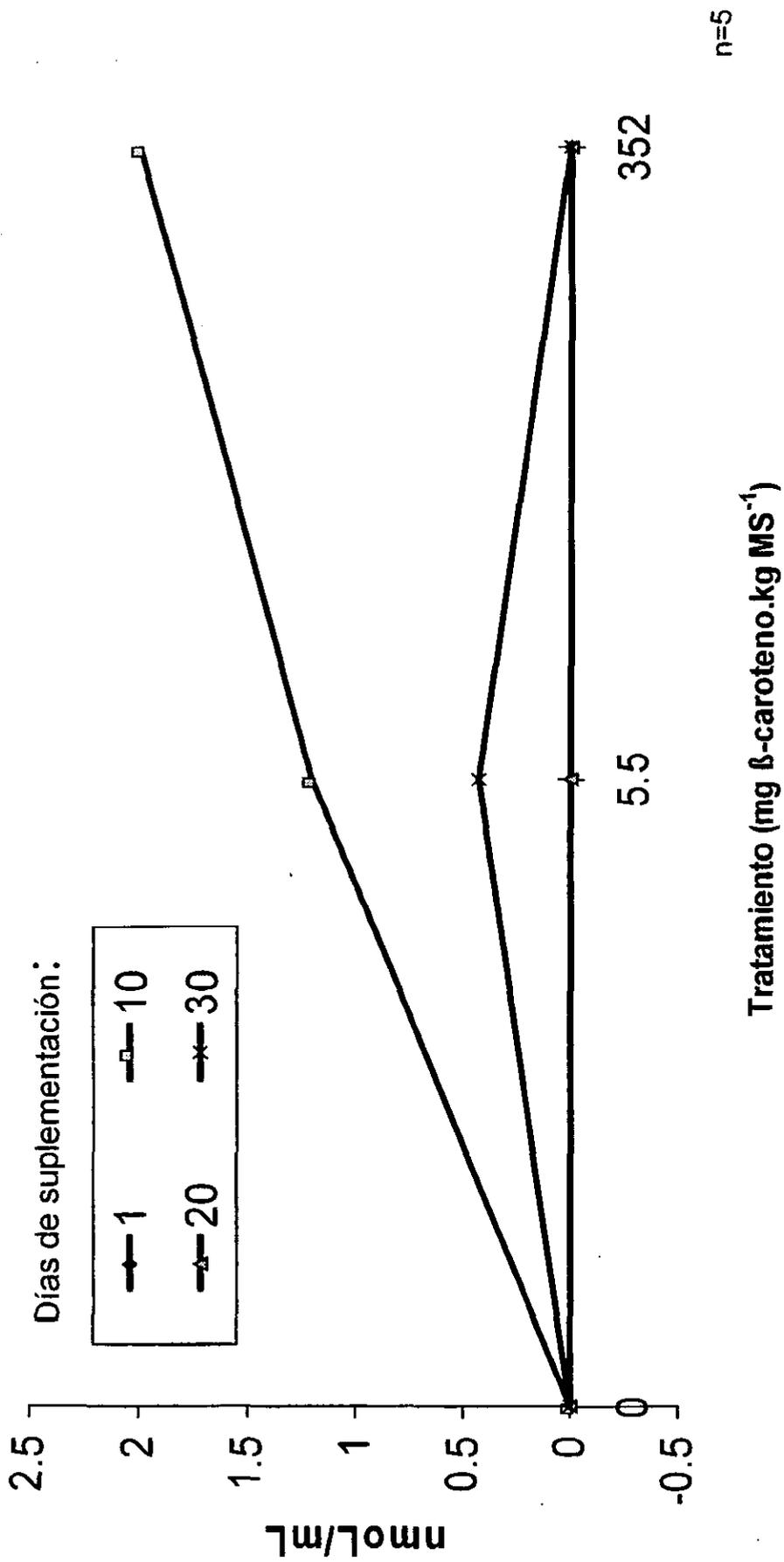


Figura 2. Efecto del nivel y los días de suplementación de β -caroteno en la dieta, sobre la concentración de β -caroteno en el plasma de cabras.

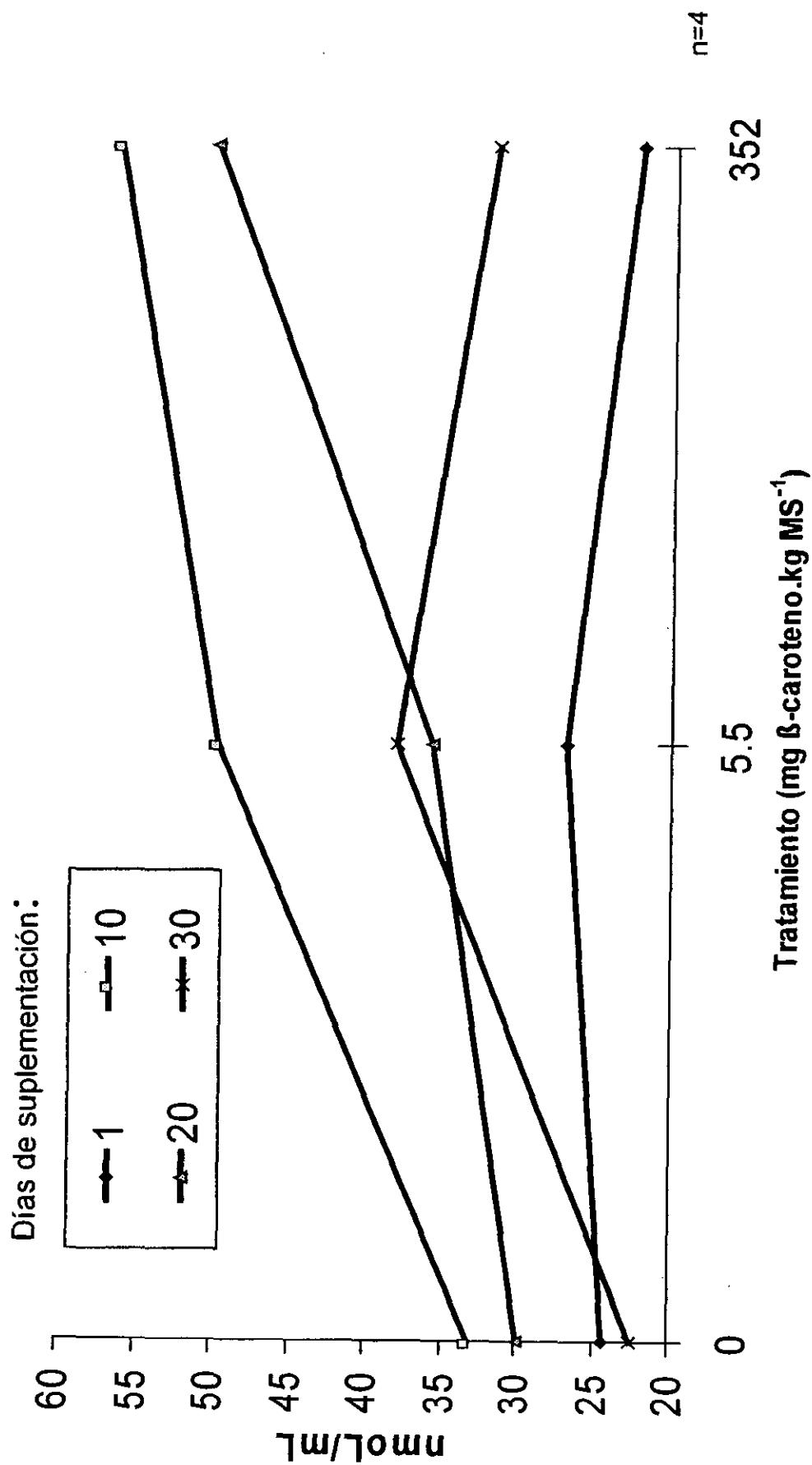


Figura 3. Efecto del nivel y los días de suplementación de β -caroteno en la dieta, sobre la concentración de retinol en el plasma de vaquillas Angus.

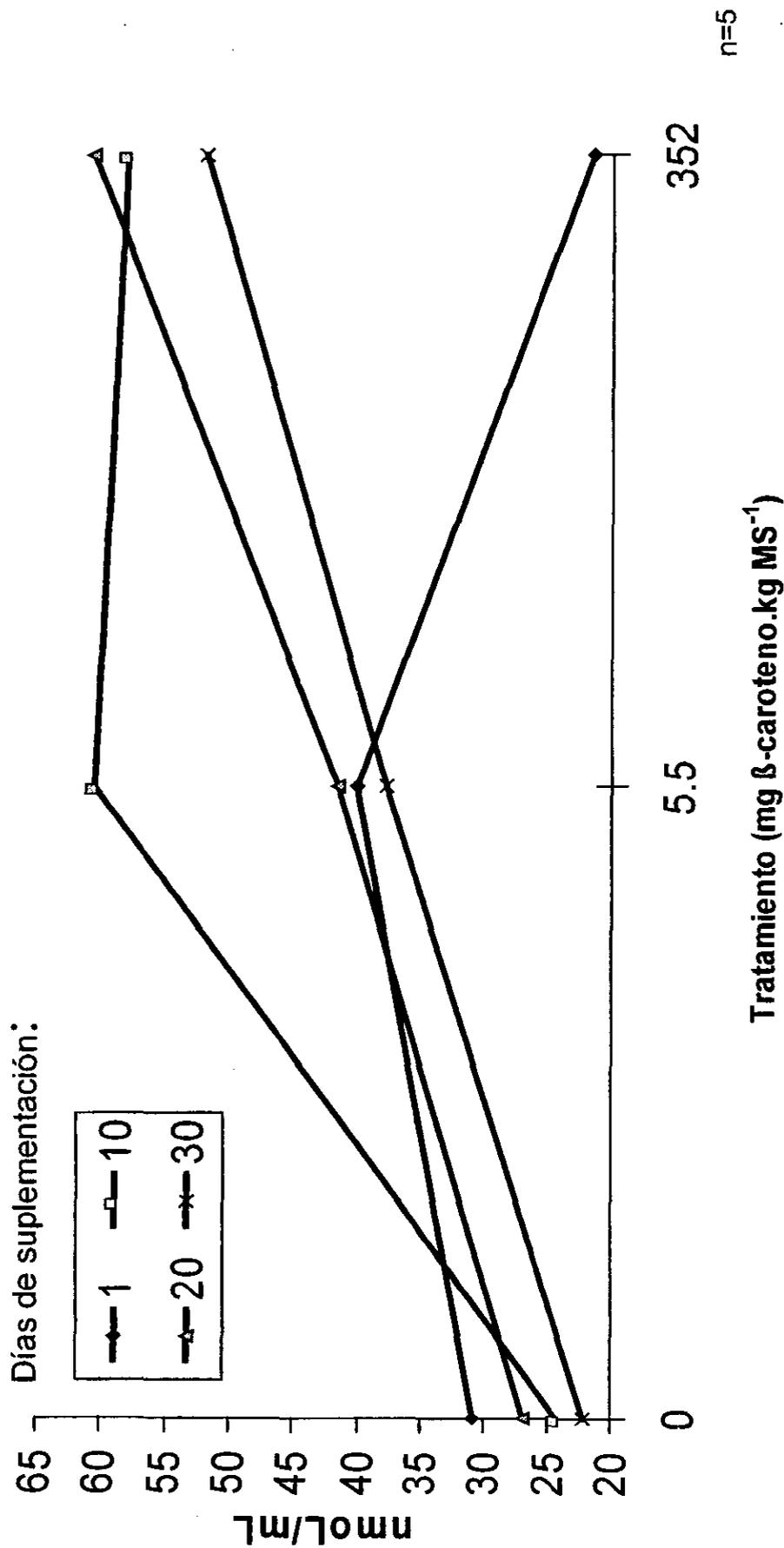


Figura 4. Efecto del nivel y los días de suplementación de β -caroteno en la dieta, sobre la concentración de retinol en el plasma de cabras.

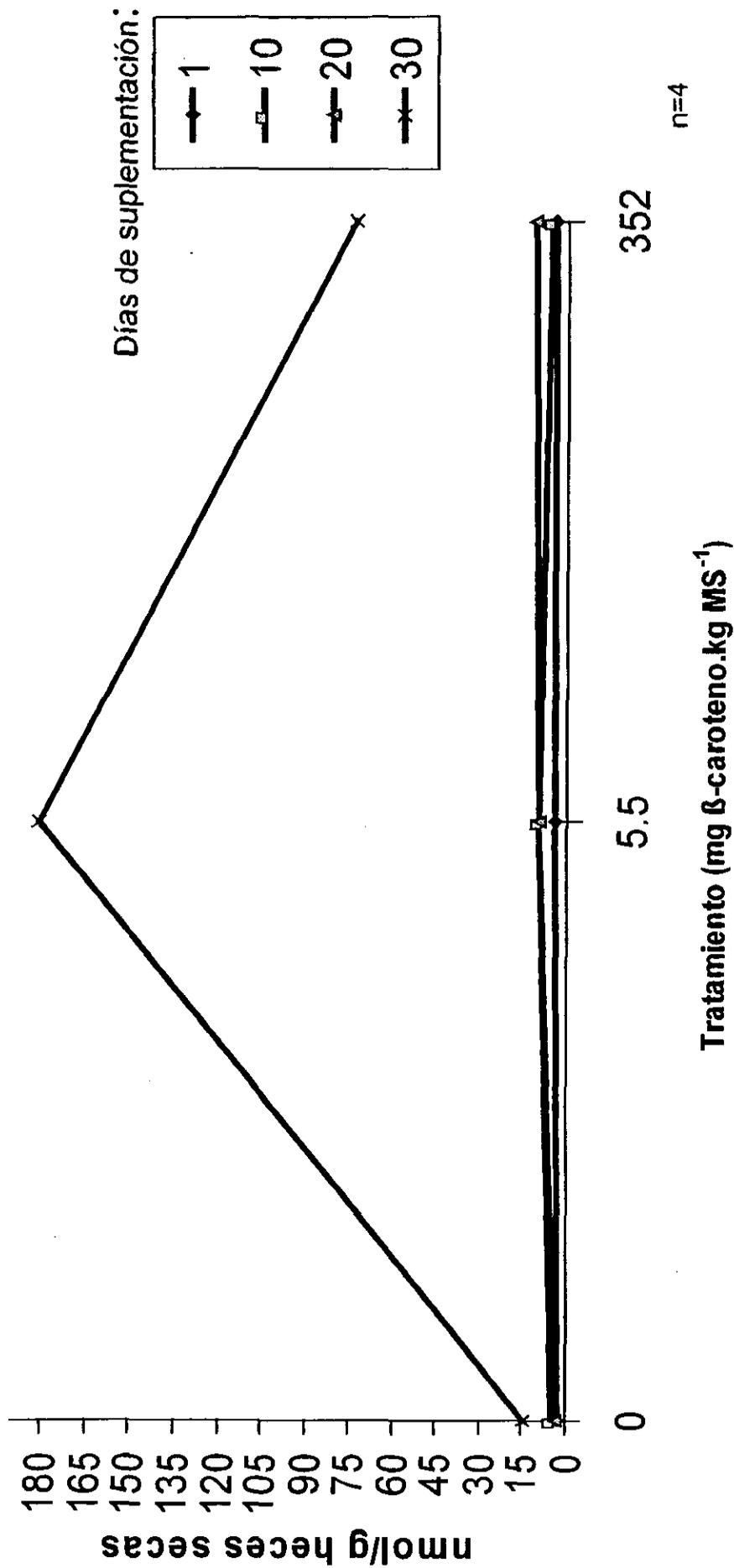


Figura 5. Efecto del nivel y los días de suplementación de β -caroteno en la dieta, sobre la concentración de β -caroteno las heces de vaquillas Angus.

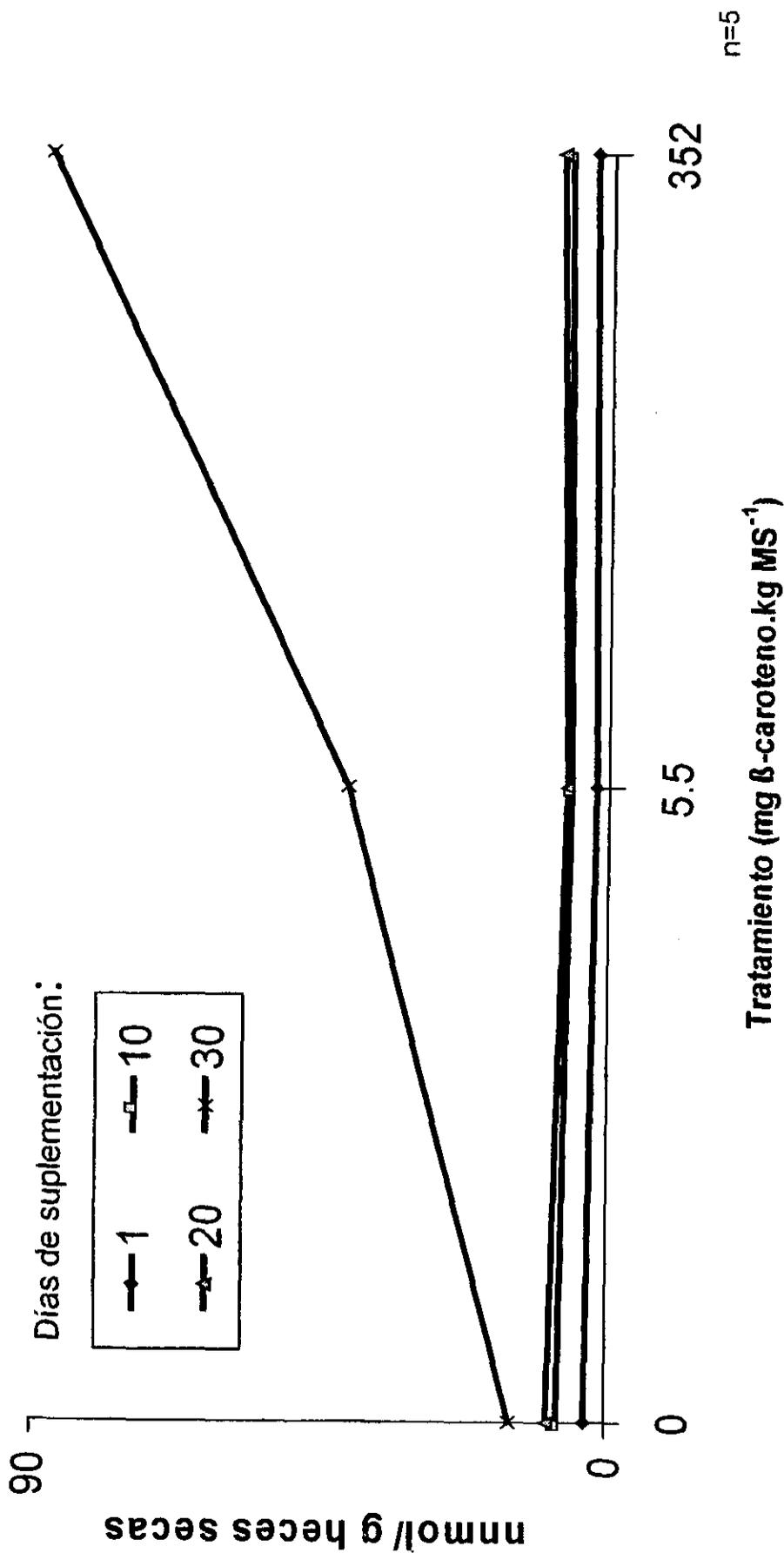


Figura 6. Efecto del nivel y los días de suplementación de β -caroteno en la dieta, sobre la concentración de β -caroteno en las heces de cabras.

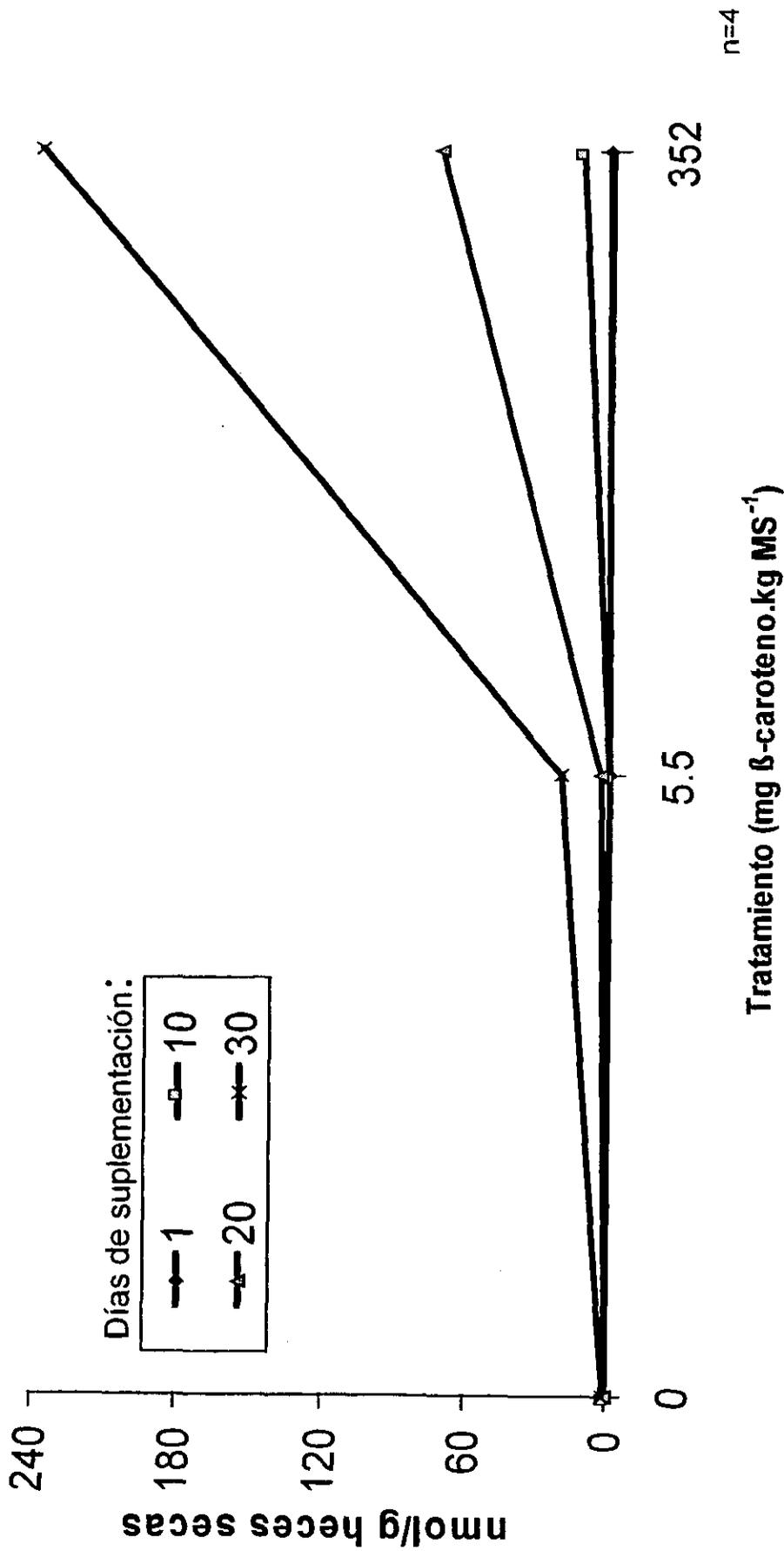


Figura 7. Efecto del nivel y los días de suplementación de β -caroteno en la dieta, sobre la concentración de retinol en heces de vaquillas Angus.

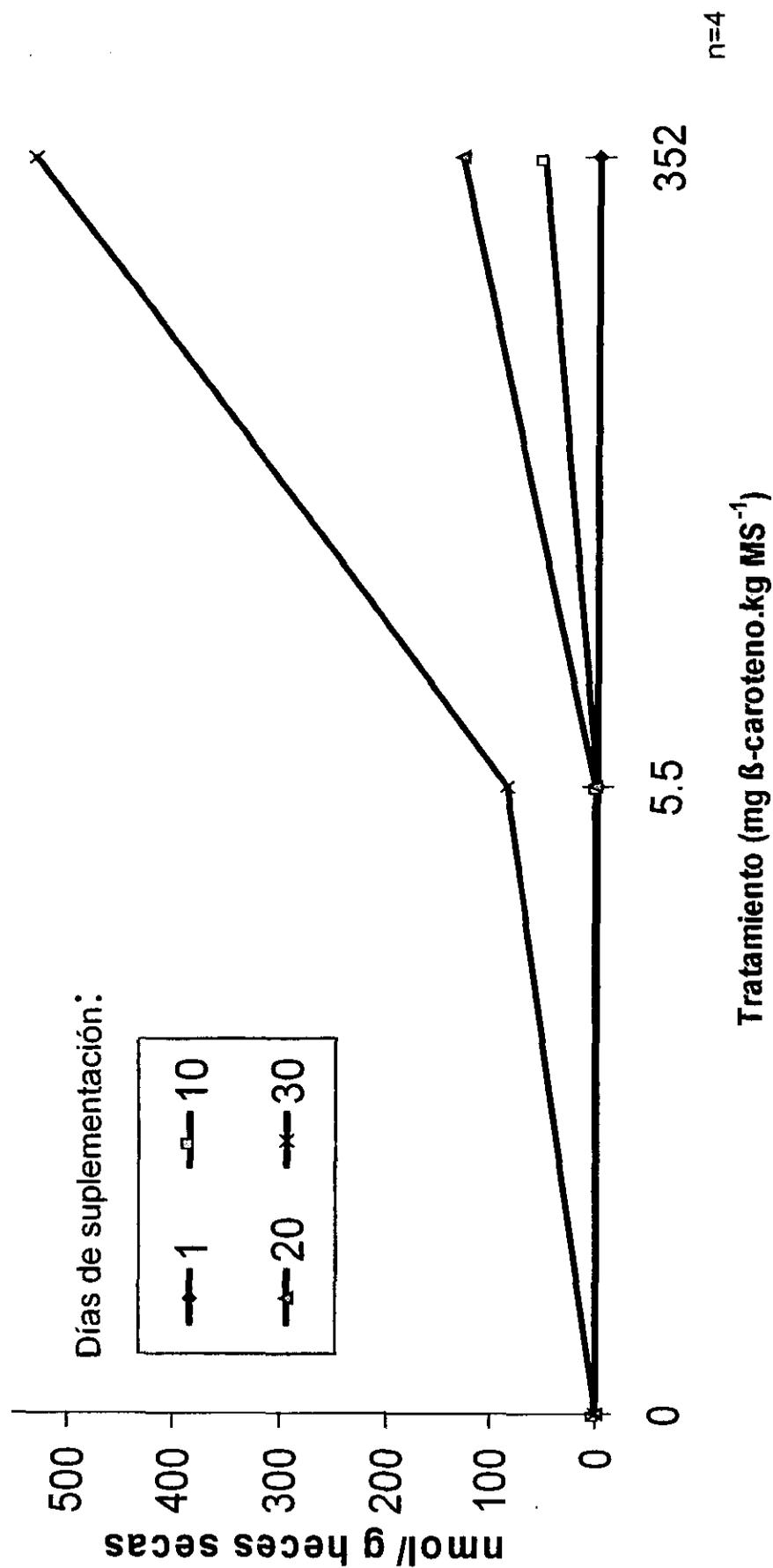


Figura 8. Efecto del nivel y los días de suplementación de β -caroteno en la dieta, sobre la concentración de retinol en heces de cabras.

Anexo 3. Cuadros de análisis de varianza (ANDEVA) para la Etapa 1

ANDEVA DEL METODO *in vitro* EN NOVILLOS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	0.04277	0.04277	8.716	0.0043
Error	67	0.32873	0.00491		
Total corregido	68	0.37150	E.E		P>T
Intercepto	1	0.063582	0.01181699	5.381	0.0001
Hora	1	0.001169	0.00039613	2.952	0.0043

valor de $r^2 = 0.1151$

ANDEVA DEL METODO *in vitro* EN NOVILLOS, VARIABLE: LUTEINA

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	0.15041	0.15041	24.932	0.0001
Error	67	0.40419	0.00603		
Total corregido	68	0.55460	E.E		P>T
Intercepto	1	0.076194	0.01310316	5.815	0.0001
Hora	1	0.002193	0.00043924	4.993	0.0001

Valor de $r^2 = 0.2712$

ANDEVA DEL METODO *in vitro* EN NOVILLOS, VARIABLE: CAROTENOS TOTALES

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	0.13031	0.13031	27.720	0.0001
Error	67	0.31497	0.00470		
Total corregido	68	0.44528	E.E		P>T
Intercepto	1	0.047400	0.01156696	4.098	0.0001
Hora	1	0.002041	0.00038774	5.265	0.0001

valor de $r^2 = 0.2927$

ANDEVA DEL METODO *in vitro* EN NOVILLOS, VARIABLE: XANTOFILAS TOTALES

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	0.32142	0.32142	36.728	0.0001
Error	67	0.58634	0.00875		
Total corregido	68	0.90776	E.E		P>T
Intercepto	1	0.062771	0.01578188	3.977	0.0002
Hora	1	0.003206	0.00052904	6.060	0.0001

valor de $r^2 = 0.3541$

ANDEVA DEL METODO *in situ* EN NOVILLOS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0.85940	0.42970	197.391	0.0001
Error	62	0.13497	0.00218		
Total corregido	64	0.99437	E.E		P>T
Intercepto	1	0.587859	0.01107139	53.097	0.0001
Hora	1	0.013661	0.00109470	12.480	0.0001
Horacuadrada	1	-0.000135	0.00001614	-8.352	0.0001

valor de r2 = 0.8643

ANDEVA DEL METODO *in situ* EN NOVILLOS, VARIABLE: LUTEINA

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	1.19892	0.59946	176.868	0.0001
Error	62	0.21014	0.00339		
Total corregido	64	1.140906	E.E		P>T
Intercepto	1	0.519109	0.01381461	37.577	0.0001
Hora	1	0.016483	0.00136594	12.067	0.0001
Horacuadrada	1	-0.000165	0.00002014	-8.203	0.0001

valor de r2 = 0.8509

ANDEVA DEL METODO *in situ* EN NOVILLOS, VARIABLE: CAROTENOS TOTALES

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0.41577	0.20788	182.782	0.0001
Error	62	0.07051	0.00114		
Total corregido	64	0.48628	E.E		P>T
Intercepto	1	0.696197	0.00800251	86.997	0.0001
Hora	1	0.010039	0.00079126	12.688	0.0001
Horacuadrada	1	-0.000103	0.00001167	-8.355	0.0001

valor de r2 = 0.8550

ANDEVA DEL METODO *in situ* EN NOVILLOS, VARIABLE: XANTOFILAS TOTALES

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0.52588	0.26294	214.885	0.0001
Error	62	0.07587	0.00122		
Total corregido	64	0.60175	E.E		P>T
Intercepto	1	0.652526	0.01107139	78.612	0.0001
Hora	1	0.011098	0.00109470	13.522	0.0001
Horacuadrada	1	-0.000113	0.00001614	-9.301	0.0001

valor de r2 = 0.8739

ANDEVA DEL METODO *in vitro* EN CABRAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	0.04277	0.04277	8.716	0.0043
Error	67	0.32873	0.00491		
Total corregido	68	0.37150	E.E		P>T
Intercepto	1	0.084582	0.01181699	5.381	0.0001
Hora	1	0.001169	0.00039613	2.952	0.0043

valor de $r^2 = 0.1151$

ANDEVA DEL METODO *in vitro* EN CABRAS, VARIABLE: LUTEINA

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	0.15041	0.15041	24.932	0.0001
Error	67	0.40419	0.00603		
Total corregido	68	0.55460	E.E		P>T
Intercepto	1	0.076194	0.01310316	5.815	0.0001
Hora	1	0.002193	0.00043924	4.993	0.0001

Valor de $r^2 = 0.2712$

ANDEVA DEL METODO *in vitro* EN CABRAS, VARIABLE: CAROTENOS TOTALES

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	0.13031	0.13031	27.720	0.0001
Error	67	0.31497	0.00470		
Total corregido	68	0.44528	E.E		P>T
Intercepto	1	0.047400	0.01156696	4.098	0.0001
Hora	1	0.002041	0.00038774	5.265	0.0001

valor de $r^2 = 0.2927$

ANDEVA DEL METODO *in vitro* EN CABRAS, VARIABLE: XANTOFILAS TOTALES

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	0.32142	0.32142	36.728	0.0001
Error	67	0.58634	0.00875		
Total corregido	68	0.90776	E.E		P>T
Intercepto	1	0.062771	0.01578188	3.977	0.0002
Hora	1	0.003206	0.00052904	6.060	0.0001

valor de $r^2 = 0.3541$

ANDEVA DEL METODO *in situ* EN CABRAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0.42379	0.21190	93.572	0.0001
Error	44	0.09964	0.00226		
Total corregido	46	0.52343	E.E		P>T
Intercepto	1	0.630792	0.01429757	44.119	0.0001
Hora	1	0.012783	0.00131058	9.754	0.0001
Horacuadrada	1	-0.000135	0.00001907	-7.071	0.0001

valor de $r^2 = 0.8096$

ANDEVA DEL METODO *in situ* EN CABRAS, VARIABLE: LUTEINA

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0.59976	0.29988	95.794	0.0001
Error	44	0.13774	0.00313		
Total corregido	46	0.73751	E.E		P>T
Intercepto	1	0.565641	0.01681050	33.648	0.0001
Hora	1	0.015039	0.00154093	9.760	0.0001
Horacuadrada	1	-0.000157	0.00002242	-7.021	0.0001

valor de $r^2 = 0.8132$

ANDEVA DEL METODO *in situ* EN CABRAS, VARIABLE: CAROTENOS TOTALES

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0.22001	0.11001	94.768	0.0001
Error	44	0.05107	0.00116		
Total corregido	46	0.27109	E.E		P>T
Intercepto	1	0.718391	0.01023650	70.179	0.0001
Hora	1	0.010010	0.00093832	10.668	0.0001
Horacuadrada	1	-0.000112	0.00001365	-8.177	0.0001

valor de $r^2 = 0.8116$

ANDEVA DEL METODO *in situ* EN CABRAS, VARIABLE: XANTOFILAS TOTALES

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0.27721	0.13860	157.760	0.0001
Error	44	0.03866	0.00088		
Total corregido	46	0.31586	E.E		P>T
Intercepto	1	0.680060	0.00890561	76.363	0.0001
Hora	1	0.010933	0.00081633	13.392	0.0001
Horacuadrada	1	-0.000120	0.00001188	-10.080	0.0001

valor de $r^2 = 0.8776$

Anexo 4. Cuadros de análisis de varianza (ANDEVA) para la Etapa 2

ANDEVA DEL HIGADO DE NOVILLOS, VARIABLE: CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	3	70.98653725	23.66217908	25.72	0.0045
Error	4	3.68013017	0.92003254		
Total corregido	7	74.66666742			

ANDEVA DEL HIGADO DE NOVILLOS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	3	12338.85431295	4112.95143765	10.56	0.0227
Error	4	1558.35618769	389.58904692		
Total corregido	7	13897.21050064			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO SUBCUTANEO DE NOVILLOS, VARIABLE: CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	3	18.11658022	6.03886007	9.39	0.0278
Error	4	2.57344333	0.64336083		
Total corregido	7	20.69002355			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO SUBCUTANEO DE NOVILLOS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	3	0.00722957	0.00240986	0.18	0.9036
Error	4	0.05302142	0.01325535		
Total corregido	7	0.06025099			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO PERIRRENAL DE NOVILLOS, VARIABLE: CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	3	0.07220609	0.02406870	7.45	0.0409
Error	4	0.01291693	0.00322923		
Total corregido	7	0.08512301			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO SUBCUTANEO DE NOVILLOS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	3	0.01237966	0.00412655	1.70	0.3042
Error	4	0.00972344	0.00243086		
Total corregido	7	0.02210309			

ANDEVA DEL DIA 10 PARA LIQ. RUMINAL, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	1	1808658.502	1808658.502	30.417	0.0001
Error	15	891924.592	59461.639		
Total corregido	16	2700583.094	E.E		P>T
betacon	1	1.895338	0.34365835	5.515	0.0001

valor de $r^2 = 0.6647$

ANDEVA DEL DIA 10 PARA LIQ. DUODENAL, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Model	1	8556381.1452	8556381.1452	45.045	0.0001
Error	15	2849289.3043	189952.62029		
Total corregido	16	11405670.449	E.E		P>T
betacon	1	4.122432	0.61423011	6.712	0.0001

valor de $r^2 = 0.7502$

ANDEVA DEL DIA 10 PARA HECES, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Model	1	55854.67313	55854.67313	130.175	0.0001
Error	15	6436.08173	429.07212		
Total corregido	16	62290.75486	E.E		P>T
betacon	1	0.333072	0.02919266	11.409	0.0001

valor de $r^2 = 0.8967$

ANDEVA DEL DIA 20 PARA LIQ. RUMINAL, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Model	1	9295144.6703	9295144.6703	122.768	0.0001
Error	15	1135695.7036	75713.046907		
Total corregido	16	10430840.374	E.E		P>T
betacon	1	4.296715	0.38778751	11.080	0.0001

valor de $r^2 = 0.8911$

ANDEVA DEL DIA 20 PARA LIQ. DUODENAL, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Model	1	111252226.38	111252226.38	37.291	0.0001
Error	15	44750730.808	2983382.0539		
Total corregido	16	156002957.18	E.E		P>T
betacon	1	14.864928	2.43423719	6.107	0.0001

valor de $r^2 = 0.7131$

ANDEVA DEL DIA 20 PARA HECES, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Model	1	52800.40440	52800.40440	233.066	0.0001
Error	15	3398.21129	226.54742		
Total corregido	16	56198.61569	E.E		P>T
betacon	1	0.323837	0.02121231	15.266	0.0001

valor de $r^2 = 0.9395$

ANDEVA DEL DIA 30 PARA LIQ. RUMINAL, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Model	1	52182371.3	52182371.3	365.609	0.0001
Error	15	2140911.5123	142727.43415		
Total corregido	16	54323282.813	E.E		P>T
betacon	1	10.180529	0.53242959	19.121	0.0001

valor de $r^2 = 0.9606$

ANDEVA DEL DIA 30 PARA LIQ. DUODENAL, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Model	1	326132041.63	326132041.63	242.294	0.0001
Error	15	20190262.659	1346017.5106		
Total corregido	16	346322304.29	E.E		P>T
betacon	1	25.451020	1.63506044	15.566	0.0001

valor de $r^2 = 0.9417$

ANDEVA DEL DIA 30 PARA HECES, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Model	1	64120.90410	64120.90410	69.363	0.0001
Error	15	13866.40102	924.42673		
Total corregido	16	77987.30511	E.E		P>T
betacon	1	0.356869	0.04284940	8.328	0.0001

valor de $r^2 = 0.8222$

Anexo 5. Cuadros de análisis de varianza (ANDEVA) para la Etapa 3

ANDEVA DEL PLASMA DE VAQUIILLAS, VARIABLE: CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	20	983668.08771380	49183.40438569	38.34	0.0001
Error	75	96211.43848912	1282.81917985		
Total corregido	95	1079879.52620292			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	458188.27476916	229094.13738458	178.59	0.0001
ANIM(TRAT)	9	91070.61711263	10118.95745696	7.89	0.0001
DIA	3	175505.44127463	58501.81375821	45.60	0.0001
TRAT*DIA	6	258903.75455738	43150.62575956	33.64	0.0001

ANDEVA DEL PLASMA DE VAQUIILLAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	20	13711.54656823	685.57732841	7.50	0.0001
Error	75	6851.80531742	91.35740423		
Total corregido	95	20563.35188565			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	2816.12876078	1408.06438039	15.41	0.0001
ANIM(TRAT)	9	2279.15328728	253.23925414	2.77	0.0074
DIA	3	6461.27523742	2153.75841247	23.58	0.0001
TRAT*DIA	6	2154.98928275	359.16488046	3.93	0.0018

ANDEVA DEL PLASMA DE CABRAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	22	74.19969289	3.37271331	3.62	0.0001
Error	89	83.00577808	0.93264919		
Total corregido	111	157.20547097			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	4.88093056	2.44046528	2.62	0.0787
ANIM(TRAT)	11	29.68390924	2.69853720	2.89	0.0027
DIA	3	22.00280971	7.33426990	7.86	0.0001
TRAT*DIA	6	14.09587753	2.34931292	2.52	0.0268

ANDEVA DEL PLASMA DE CABRAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	22	30374.54095003	1380.66095227	5.89	0.0001
Error	89	20854.10401633	234.31577546		
Total corregido	111	51228.64496636			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	9698.67269181	4849.33634590	20.70	0.0001
ANIM(TRAT)	11	7306.11405959	664.19218724	2.83	0.0032
DIA	3	4384.62785206	1461.54261735	6.24	0.0007
TRAT*DIA	6	8086.90941334	1347.81823556	5.75	0.0001

ANDEVA DE LAS HECES DE VAQUILLAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	20	18623745808.89060000	931187290.44453000	6.05	0.0001
Error	75	11535685473.78860000	153809139.65051500		
Total corregido	95	30159431282.67920000			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	2223266257.04100000	1111633128.52050000	7.23	0.0013
ANIM(TRAT)	9	3447627072.84269000	383069674.76029900	2.49	0.0151
DIA	3	7363595057.40641000	2454531685.80213000	15.96	0.0001
TRAT*DIA	6	5589257421.60050000	931542903.60008400	6.06	0.0001

ANDEVA DE LAS HECES DE VAQUILLAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	20	3441770584.43559000	172088529.22177900	5.79	0.0001
Error	75	2229308355.64379000	29724111.40858390		
Total corregido	95	5671078940.07938000			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	1180636173.5806900	590318086.79034500	19.86	0.0001
ANIM(TRAT)	9	597380448.60956700	66375605.40106300	2.23	0.0287
DIA	3	677440296.99599200	225813432.33199700	7.60	0.0002
TRAT*DIA	6	986313665.24933900	164385610.87488900	5.53	0.0001

ANDEVA DE LAS HECES DE CABRAS VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	22	5165960240.83112000	234816374.58323200	4.99	0.0001
Error	89	4184179358.78279000	47013251.22227850		
Total corregido	111	9350139599.61391000			

Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	415490229.47021700	207745114.73510800	4.42	0.0148
ANIM(TRAT)	11	1251377011.65779000	113761546.51434500	2.42	0.0111
DIA	3	1956466344.2497600	652155448.08325400	13.87	0.0001
TRAT*DIA	6	1298024366.64540000	216337394.44090000	4.60	0.0004

ANDEVA DE LAS HECES DE CABRAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	22	190430648385.1210	8655938562.9600600	8.03	0.0001
Error	89	95901339888.1792	1077543144.8110000		
Total corregido	111	286331988273.3000			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	46498285697.36520	23249142848.68260	21.58	0.0001
ANIM(TRAT)	11	32915293311.95390	2992299391.99581	2.78	0.0038
DIA	3	42653516014.76950	14217838671.58980	13.19	0.0001
TRAT*DIA	6	61538344992.84430	10256390832.14070	9.52	0.0001

ANDEVA DEL HIGADO DE VAQUILLAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	34357.14840739	17178.57420369	587.96	0.0001
Error	25	730.42684122	29.21707365		
Total corregido	27	35087.57524860			

ANDEVA DEL HIGADO DE VAQUILLAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	5514090.69257962	2757045.34628981	46.95	0.0001
Error	25	469055.79317512	18762.23172700		
Total corregido	27	5983146.48575474			

ANDEVA DEL HIGADO DE CABRAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	1.16012747	0.58006373	4.56	0.0205
Error	25	3.18256338	0.12730254		
Total corregido	27	4.34269084			

ANDEVA DEL HIGADO DE CABRAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	649152.44673732	324576.22336866	8.12	0.0019
Error	25	999188.47528654	39967.53901146		
Total corregido	27	1648340.92202386			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO SUBCUTANEO DE VAQUILLAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	1020.59042089	510.29521044	23.22	0.0001
Error	25	549.50624570	21.98024983		
Total corregido	27	1570.09666658			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO SUBCUTANEO DE VAQUILLAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	275.71484094	137.85742047	1.71	0.2014
Error	25	2015.95447238	80.63817890		
Total corregido	27	2291.66931332			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO SUBCUTANEO DE CABRAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0	0		
Error	25	0	0		
Total corregido	27	0			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO SUBCUTANEO DE CABRAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	452.42343229	226.21171614	14.93	0.0001
Error	25	378.79084128	15.15163365		
Total corregido	27	831.21427357			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO PERIRRENAL DE VAQUILLAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	7.25657863	3.62828931	12.51	0.0002
Error	25	7.25033055	0.29001322		
Total corregido	27	14.50690918			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO PERIRRENAL DE VAQUILLAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	94.12267980	47.06133990	0.76	0.4793
Error	25	1553.12271353	62.12490854		
Total corregido	27	1647.24539334			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO PERIRRENAL DE CABRAS, VARIABLE: β -CAROTENO

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	0	0		
Error	25	0	0		
Total corregido	27	0			

ANDEVA DEL TEJIDO ADIPOSEO PERIRRENAL DE CABRAS, VARIABLE: RETINOL

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	2	739.57053346	369.78526673	3.46	0.0471
Error	25	2669.93989467	106.79759579		
Total corregido	27	3409.51042813			

ANDEVA DE LA ACTIVIDAD DE 15,15'DIOXIGENASA INTESTINAL EN VAQUILLAS

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	19	2.05247492	0.10802500	3.37	0.0037
Error	22	0.70618411	0.03209928		
Total corregido	41	2.75865903			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	0.41638610	0.20819305	6.49	0.0061
IDEN(TRAT)	11	0.43194221	0.03926747	1.22	0.3291
PORCION	2	1.18085221	0.59042611	18.39	0.0001

TRAT*PORCION 4 0.02964279 0.00741070 0.23 0.9181

ANDEVA DE LA ACTIVIDAD DE 15,15'DIOXIGENASA INTESTINAL EN CABRAS

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	19	18.33423485	0.96495973	26.53	0.0001
Error	22	0.80025006	0.03637500		
Total corregido	41	19.13448491			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	1.19908722	0.59954361	16.48	0.0001
IDEN(TRAT)	11	0.48293758	0.04390342	1.21	0.3385
PORCION	2	16.18193604	8.09096802	222.43	0.0001
TRAT*PORCION	4	0.47027401	0.11756850	3.23	0.0314

ANDEVA DE LA ACTIVIDAD DE 15,15'DIOXIGENASA HEPATICA EN VAQUILLAS

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	11	2.64486198	0.24044200	39.11	0.0001
Error	12	0.07377731	0.00614811		
Total corregido	23	2.71863929			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	0.59151200	0.29575600	48.11	0.0001
IDEN(TRAT)	9	2.05334997	0.22815000	37.11	0.0001

ANDEVA DE LA ACTIVIDAD DE 15,15'DIOXIGENASA HEPATICA EN CABRAS

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Pr > F
Modelo	13	7.78599949	0.59892304	6.89	0.0005
Error	14	1.21727064	0.08694790		
Total corregido	27	9.00327014			
Fuente	G.L.	SS Tipo III	C.M.	F	Pr > F
TRAT	2	1.53086708	0.76543354	8.80	0.0033
IDEN(TRAT)	11	6.25513241	0.56864840	6.54	0.0008

Anexo 6. Procedimiento para marcar la fibra con yterbio por el método de inmersión-lavado (Goetsch y Galyeen, 1983)

1. Colocar 100 g del forraje (tal como se ofrece en el alimento) en un litro de solución de yterbio (disolver 5.0 g de $\text{YbCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por litro de agua destilada). Reposar por 24 horas con agitación periódica (3-4 veces por d).
2. Lavar al menos 6 veces con agua corriente para remover el marcador no unido al forraje.
3. Secar el forraje en una estufa de aire forzado a 55°C por 48 horas.

Anexo 7. Procedimiento para la determinación de yterbio y cromo (Poore et al. 1990)

1. Pesar 2.5 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 ml.
2. Agregar 10 ml de ácido nítrico y 10 ml de ácido clorhídrico.
3. Dejar reposar por 15 a 20 min. Si las muestras empiezan a levantar espuma, agitar los matraces.
4. Colocar los matraces en una platina precalentada. La temperatura de esta debe ser lo suficientemente caliente para permitir que las muestras hiervan sin quemarlas.
5. Agitar ocasionalmente hasta que la mayoría de los gases se haya ido (toma aproximadamente 25 a 30 min).
6. Sacar los matraces de la platina, reposar por un minuto y agregar 10 ml de ácido clorhídrico (tratando de arrastrar el material adherido a las paredes del matraz)
7. Regresar los matraces a la platina caliente y calentar hasta que la mayoría de los gases se haya ido (40-50 min). El residuo toma un color amarillento y consistencia gruesa.
8. Sacar los matraces de la platina y enjuagar las paredes con agua desionizada. Permitir que se enfríen antes del filtrado (30-40 min).
9. Filtrar el contenido de los matraces en matraces volumétricos de 50 ó 100 ml (papel filtro no. 1). Enjuagar varias veces con agua desionizada. Enjuagar el papel filtro al menos 1 vez.
10. Remover el papel filtro y enjuagar el embudo.
11. Aforar al volúmen final con agua desionizada.
12. Mezclar bien y transferir una muestra a frascos de polipropileno para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica.
13. Los parámetros utilizados en el espectrofotómetro de absorción atómica fueron los siguientes:

Yterbio:

Wavelength : 398.8

Slit width : 0.2

Gases de la flama : Oxido nitroso-acetileno

Cromo:

Wavelength : 357.9

Slit width : 0.7

Gases de la flama : Aire-Acetileno

Anexo 8. Programa SAS para modelos de dos compartimientos, edad-dependiente, edad-independiente (Ellis et al. 1979; Pond et al. 1988)

*THIS FILE IS A:EX2RPADJ.NLN;

OPTIONS PS=60 PAGENO=1;
TITLE 'G3G1 MODEL/YTTERB b caroteno';
DATA G3G1;
INFILE 'B:\Cinetica.PR2';
INPUT ani trt PER time WT YB;

****DELETING SAMPLES LOWER THAN THE DETECTION LIMIT;
*IF CO < .10 THEN CO = 0;
IF YB < .10 THEN YB = 0;

****SAMPLES WERE DILUTED TO 100 ML;
****CONVERTING LIQUID PPM TO MG MARKER PER KG OF FECES (DRY PPM);
YBPPM=(YB*100)/WT;
Y=YBPPM;
TP=TIME;
IF TP<0 THEN DELETE;
PROC SORT; BY ani trt PER;
PROC NLIN BEST=5 ITER=50 CONVERGENCE=.0000METHOD=MARQUARDT;
BY ani trt PER;

*****BEGIN TWO COMPARTMENT G3G1 MODEL*****;

** C0 = zero hour concentration in mg marker per KILOGRAM
of feces (not mg/g as in Grovum & Williams)
L1 = lambda 1 (age dependent, not corrected for gamma
time dependency)
K2 = slow or ruminal passage rate, age independent
TAU = lag time, time delay, or tau (representing time
to first appearance in the feces);

PARMS C0= 100 600 1100
L1= .4 .5 .6
K2= .01 .02 .03
TAU= 1 10 15 ;
BOUNDS 1<C0, .001<L1, .001<K2, 0<TAU;
T=TP-TAU;
IF T<0 THEN GO TO ALPHA;
A=L1;

```

B=K2;
A2=A**2;
A3=A**3;
S=A-B;
S2=S**2;
S3=S**3;
D11=A/S;
D12=A/S2;
D22=A2/S2;
D23=A2/S3;
D31=A3/S;
D32=A3/S2;
D33=A3/S3;
F12=-B/S2;
T2=T**2;
E1=EXP(-A*T);
E2=EXP(-B*T);
DIFF=E2-E1;
SUM=(D32*T)+(D31*T2)/2;
TEMP=(D33*DIFF)-(E1*SUM);
MODEL Y=C0*TEMP;
DER.C0=TEMP;
G1=3*D22*F12;
G2=3*D22*D12;
G3=D23*(A-3*B);
G4=D22*(2*A-3*B);
DER.L1=C0*((G1*DIFF)+(T*D33*E1)+(T*E1*SUM)-E1*(T*G3+T2*G4/2));
DER.K2=C0*((G2*DIFF)-(T*D33*E2)-E1*(2*T*D33+T2*D32/2));
DER.TAU=C0*((D33*(B*E2-A*E1))-(A*E1*SUM)+E1*(D32+T*D11*A2));
**MODEL Y=C0*(((EXP(-K2*T))*((-L1/(K2-L1))**3))-EXP(-L1*T)*
  (((-L1/(K2-L1))*((L1*T)**2)/2))+(((L1/(K2-L1))**2)*(L1*T))+
  (-L1/(K2-L1))**3));
GO TO BETA;
ALPHA:
  MODEL Y=0.0;
  DER.C0=0.0;
  DER.L1=0.0;
  DER.K2=0.0;
  DER.TAU=0.0;
BETA:;
*****END TWO COMPARTMENT G3G1 MODEL*****;

```

OUTPUT OUT=POINTS1 PREDICTED=YHAT PARMS=C0 L1 K2 TAU

```

RESIDUAL=RESID;
PROC SORT DATA=POINTS1; BY ani trt per;
DATA OK; MERGE POINTS1 G3G1;
PROC PRINT;
PROC PLOT; BY ani trt PER ;
PLOT YHAT*TP='*' Y*TP='A'/OVERLAY;
LABEL TP='HOUR POST DOSE';
RUN;
OPTIONS PS=60 PAGENO=1;
TITLE 'G4G1 MODEL/YTTERB b caroteno';
DATA G4G1;
  INFILE 'c:\ofelia\cinetica.PR2';
  INPUT ani trt PER time WT YB;

****DELETING SAMPLES LOWER THAN THE DETECTION LIMIT;
IF YB < .10 THEN YB = 0;

****SAMPLES WERE DILUTED TO 100mL;
****CONVERTING LIQUID PPM TO MG MARKER PER KG OF FECES (DRY
PPM);
YBPPM=(YB*100)/WT;

Y=YBPPM;
TP=TIME;
IF TP<0 THEN DELETE;
PROC SORT; BY ani trt PER;
PROC      NLIN      BEST=5      ITER=50      CONVERGENCE=.00001
METHOD=MARQUARDT;
  BY ani trt PER;
PARMS C0= 100 600 1100
      L1= .4 .5 .6
      K2= .01 .02 .03
      TAU= 1 10 15 ;
BOUNDS 1<C0, .01<L1, .001<K2, 0<TAU;
T=TP-TAU;
IF T<0 THEN GO TO ALPHA;
A=L1;
B=K2;
A2=A**2;
A3=A**3;
A4=A**4;
S=A-B;
S2=S**2;

```

```

S3=S**3;
S4=S**4;
D11=A/S;
D12=A/S2;
D34=A3/S4;
D44=A4/S4;
D43=A4/S3;
D32=A3/S2;
D33=A3/S3;
D42=A4/S2;
D41=A4/S;
F=-B/S2;
T2=T**2;
T3=T**3;
E1=EXP(-A*T);
E2=EXP(-B*T);
DIFF=E2-E1;
SUM=(D43*T)+(D42*T2)/2 +(D41*T3)/6;
TEMP=(D44*DIFF)-(E1*SUM);
MODEL Y=C0*TEMP;
DER.C0=TEMP;
G1=4*D33*F;
G2=4*D33*D12;
G3=D34*(A-4*B);
G4=D33*(2*A-4*B);
G5=D32*(3*A-4*B);
DER.L1=C0*((G1*DIFF)+(T*D44*E1)+(T*E1*SUM)-E1*(T*G3+T2*G4/2+
T3*G5/6));
DER.K2=C0*((G2*DIFF)-(T*D44*E2)-E1*(3*T*D44+T2*D43+T3*D42/6));
DER.TAU=C0*(D44*(B*E2-A*E1)-A*E1*SUM+E1*(D43+T*D42+T2*D41/2));

```

GO TO BETA;

ALPHA:

MODEL Y=0.0;

DER.C0=0.0;

DER.L1=0.0;

DER.K2=0.0;

DER.TAU=0.0;

BETA.;

*****END TWO COMPARTMENT G4G1 MODEL*****.

OUTPUT OUT=POINTS4 PREDICTED=YHAT PARMS=C0 L1 K2 TAU
RESIDUAL=RESID;

```
PROC SORT DATA=POINTS4; BY ani trt PER;
DATA OK; MERGE POINTS4 G4G1;
*PROC PRINT;
PROC PLOT; BY ani trt PER;
PLOT YHAT*TP='*' Y*TP='A'/OVERLAY;
LABEL TP='HOUR POST DOSE';
RUN;
```

```
OPTIONS PS=60 PAGENO=1;
TITLE 'TESTG5G1 ADJ MODEL/YTTERB b caroteno';
DATA G5G1;
  infile 'c:\ofelia\cinetica.pr2';
  INPUT ani trt PER time WT YB;
```

```
****DELETING SAMPLES LOWER THAN THE DETECTION LIMIT;
IF YB < .10 THEN YB = 0;
```

```
****SAMPLES WERE DILUTED TO 100 ML;
****CONVERTING LIQUID PPM TO MG MARKER PER KG OF FECES (DRY
PPM);
YBPPM=(YB*100)/WT;
Y=YBPPM;
TP=TIME;
IF TP<0 THEN DELETE;
PROC SORT; BY ani trt PER;
PROC NLIN BEST=5 ITER=50 CONVERGENCE=.0000METHOD=MARQUARDT;
  BY ani trt PER;
```

```
*****BEGINNING OF TWO COMPARTMENT G5G1T*****
```

```
** C0 = zero hour concentration in mg marker per KILOGRAM
      of feces (not mg/g as in Grovum & Williams)
  L1 = lambda 1 (age dependent, not corrected for gamma
      time dependency)
  K2 = slow or ruminal passage rate, age independent
  TAU = lag time, time delay, or tau (representing time
      to first appearance in the feces);
```

```
PARMS C0= 100 600 1100
      L1= .4 .5 .6
      K2= .01 .02 .03
      TAU= 1 10 15 ;
BOUNDS 1<C0, .01<L1, .01<K2, 0<TAU;
T=TP-TAU;
```

```

IF T<0 THEN GO TO ALPHA;
MODEL Y=C0*(((EXP(-K2*T))*((-L1/(K2-L1))**5))-EXP(-L1*T)*
(((-L1/(K2-L1))*((L1*T)**4)/24))+
(((-L1/(K2-L1))**2)*((L1*T)**3)/6))+
(((-L1/(K2-L1))**3)*((L1*T)**2)/2))+
(((-L1/(K2-L1))**4)*(L1*T))+
(-L1/(K2-L1))**5));
GO TO BETA;
ALPHA:
MODEL Y=0.0;
BETA:;
*****END OF TWO COMPARTMENT G5G1T*****;

```

```

OUTPUT OUT=POINTS1 PREDICTED=YHAT PARMS C0 L1 K2 TAU ESS=ESS;
PROC SORT DATA=POINTS1; BY ani trt PER;
DATA OK; MERGE POINTS1 G5G1;
PROC PLOT; BY ani trt PER;
PLOT YHAT*TP='*' Y*TP='Y' /OVERLAY ;
LABEL TP='HOUR POST DOSE';
RUN;

```