

## Degradabilidad de carotenoides totales en alfalfa (*Medicago sativa* L) en cultivo *in vitro* con líquido ruminal

### Total carotenoid degradability in alfalfa (*Medicago sativa* L) in an *in vitro* culture with ruminal liquid

Francisco J. Vera-Vázquez<sup>1</sup> ,  
Serafín López-Garrido<sup>2</sup> ,  
Isabel Guerrero-Legarreta<sup>3</sup> ,  
Daniel Mota-Rojas<sup>4</sup> ,  
Yuridia Bautista-Martínez<sup>5</sup> ,  
Rosy G. Cruz-Monterrosa<sup>6\*</sup> 

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Programa de Ganadería. Km. 36.5, México 136, Montecillo, CP. 56230. Montecillo, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Universidad del Mar. Puerto Escondido. Ciudad Universitaria, Carretera Vía Sola de Vega, Puerto Escondido, San Pedro Mixtepec, CP. 71980. Juquila, Oaxaca, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc, Iztapalapa, CP. 09340. Ciudad de México, México.

<sup>4</sup>Universidad Autónoma Metropolitana. Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, CP. 04960. Ciudad de México, México.

<sup>5</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas. Mariano Matamoros S/N, Zona Centro, CP. 87000. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

<sup>6</sup>Universidad Autónoma Metropolitana. Av. de las Garzas #10, El panteón, CP. 52005. Lerma de Villada, Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia:  
r.cruz@correo.ler.uam.mx

#### Nota científica

Recibida: 28 de febrero 2021

Aceptada: 20 de octubre 2021

**Como citar:** Vera-Vázquez FJ, López-Garrido S, Guerrero-Legarreta I, Mota-Rojas D, Bautista-Martínez Y, Cruz-Monterrosa RG (2021) Degradabilidad de carotenoides totales en alfalfa (*Medicago sativa* L) en cultivo *in vitro* con líquido ruminal. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. II: e2929. DOI: 10.19136/era.a8nII.2929

**RESUMEN.** El objetivo del trabajo fue evaluar la degradabilidad de la materia seca (MS) y de carotenos de la alfalfa (*Medicago sativa* L) *in vitro*. Las muestras se incubaron a 39 °C a 0, 12, 24, 48 y 72 h. Los datos se procesaron con un análisis de varianza, prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los resultados del análisis de la alfalfa fueron (%): MS = 24.42, MO = 96.79, PC = 21.22, FDA = 29.11, FDN = 36.24, Cenizas = 3.21 y Carotenos totales = 254.6 mg g<sup>-1</sup>. El 43% de MS desapareció a las 12 h ( $P < 0.001$ ), mientras de 12 a 72 h, la MS alcanzó una degradación de 62% ( $P < 0.001$ ). La degradación de los carotenos de la alfalfa está asociada con el ritmo de la degradación de la MS, el estudio permitió obtener una simulación del rumen de bovinos indicando que la mayor parte de los carotenos desaparecen en menos de 12 h de incubación.

**Palabras clave:** Alimentación, bovinos,  $\beta$ -carotenos, forraje, prueba de rumen.

**ABSTRACT.** The objective of the work was to evaluate the degradability of dry matter (DM) and that of carotenes of alfalfa (*Medicago sativa* L) in an *in vitro* study. The samples were incubated at 39 °C at 0, 12, 24, 48 and 72 h. The data were processed with an analysis of variance, Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The results of the alfalfa analysis were: DM = 24.42, MO = 96.79, PC = 21.22, FDA = 29.11, NDF = 36.24, ash = 3.21 and total carotenes = 254.6 mg g<sup>-1</sup>. 43% of DM disappeared at 12 h ( $P < 0.001$ ), while from 12 to 72 h, the DM reached a degradation of 62% ( $P < 0.001$ ). The degradation of alfalfa carotenes is associated with the rate of DM degradation, the study allowed to obtain a simulation of the bovine rumen indicating that most of the carotenes disappear in less than 12 h of incubation.

**Key words:** Feed, cattle;  $\beta$ -carotenes; forage; rumen test

## INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son compuestos pertenecientes al grupo de los isoprenoides o terpenoides, todos ellos originados de un precursor común, una molécula de cinco carbonos llamada isopreno (Ordóñez y Rodríguez 2013). Los carotenos son pigmentos vegetales de importancia comercial por su diversidad de aplicaciones (García *et al.* 2015). Son sintetizados por microorganismos fotosintéticos y plantas, pero no por animales y están asociados a las fracciones lipídicas, todos los carotenoides son derivados del licopeno, el primero que se biosintetiza a partir de éste y por reacciones de ciclación se obtienen los demás pigmentos (Takaichi *et al.* 2012).

La función principal de los pigmentos carotenoides vegetales es captar energía luminosa, que es transferida a las clorofilas para ser transformada durante la fotosíntesis; los carotenoides se encuentran en una relación de tres a cuatro partes de clorofila por una parte de carotenoide, estando en el centro de estos un gran número de enlaces dobles que constituyen el cromóforo, que da la capacidad de absorber la luz y determinar la estructura molecular y actividad química (Namitha y Negi 2010). Los carotenoides se encuentran en plantas, algas y bacterias, principalmente, y son ingeridos por los animales en sus dietas. Dependiendo de su estructura y composición molecular se dividen en carotenos y xantofilas (Brenes 2014). La cantidad de carotenos por unidad de área de las hojas constituye uno de los indicadores de la capacidad fotosintética de las plantas, ya que representa una medida de las dimensiones del sistema fotosintético y de su eficiencia, lo que determina la producción de biomasa de la planta en diferentes condiciones de producción (García *et al.* 2005). Los carotenoides se pueden ver influenciados en el forraje por el genotipo, manejo precosecha, estado de madurez, así como por las operaciones de proceso y conservación, siendo los más importantes la temperatura y la intensidad de la luz (Carranco *et al.* 2011).

Los forrajes verdes tienen niveles de  $\beta$ -caroteno de aproximadamente  $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}^{-1}$  en las etapas tempranas de crecimiento (Lobón *et al.*

2015), quienes reportaron valores de  $\beta$ -caroteno de  $400 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}^{-1}$  de luteína y  $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}^{-1}$  de  $\alpha$ -tocoferol. Las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en diversas gramíneas y leguminosas varía con la madurez de la planta y en menor medida, con la especie vegetal (Larsen *et al.* 2012). Los forrajes utilizados en la alimentación del ganado bovino tienen concentraciones variables en  $\beta$ -Caroteno, por lo que es necesario determinar la cantidad de aporte suplementario para cubrir las posibles deficiencias, para la alfalfa ensilada la cantidad de  $\beta$ -carotenos que contiene es de  $117 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}^{-1}$  (Ciapinni *et al.* 2015). Mientras que Flores *et al.* (2015), reportan valores de  $42.8 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ms}^{-1}$  de  $\beta$ -Caroteno y valores de  $121.1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ms}^{-1}$  de luteína. Del mismo modo Ilieva y Vasileva (2013), reportan concentraciones de 30.55 a 86.42  $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1}$  de peso seco por efecto del nivel de fertilización.

La alta concentración de carotenoides en los forrajes imparte un color amarillo indeseable a la grasa de los bovinos, lo que afecta el precio y el consumo de la carne (Reynoso *et al.* 2004). Por lo que se sugiere que la digestión en rumiantes de los carotenoides totales en los forrajes debe corresponder con la digestión de la materia seca en los forrajes. Esta variación en la proporción de carotenoides totales que desaparecen de los forrajes en el rumen podría ser un factor que contribuya a la amplia variación en la biodisponibilidad de carotenoides de forrajes naturales por lo que para este estudio el objetivo fue evaluar la degradabilidad de la materia seca (MS) y de carotenos de la alfalfa (*Medicago sativa* L) *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

El experimento se llevó a cabo en la Unidad Metabólica de Rumiantes y el laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 de la carretera México-Texcoco en Montecillo Texcoco, Estado de México. Ubicado en las coordenadas geográficas  $19^{\circ} 20'$  latitud norte y  $98^{\circ}$

53' longitud oeste con altitud de 2 250 msnm.

### Recolección de la alfalfa

Las muestras de alfalfa se recolectaron en las praderas experimentales del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, las cuales estaban divididas en parcelas de 63 m<sup>2</sup>. Se recolectaron en siete puntos dentro de cada región y se mantuvieron en una hielera a 4 ° C, en bolsas de plástico negras, se eliminó el exceso de aire y se cerró la bolsa herméticamente para una iluminación tenue y minimizar la destrucción de carotenoides. Luego, en una habitación semi oscura, las muestras de pasto se separaron en material verde y muerto. La mayoría de la alfalfa seleccionada se encontraba en etapa de crecimiento de alargamiento y clase de madurez, de acuerdo con la metodología propuesta por Moore *et al.* (1991). Las muestras de alfalfa fresca se cortaron con tijeras en tamaños menores de 3 mm. Todas las submuestras (nueve submuestras / muestra) se mezclaron y se preparó una muestra compuesta de siete sitios de muestreo, la cual se congeló a -20 °C hasta el inicio de las determinaciones *in vitro*.

Por otro lado, una réplica de la muestra de alfalfa se molió en un molino Wiley<sup>®</sup> con malla de 1 mm. Para luego por triplicado determinar el contenido de MS mediante el secado en horno a 60 °C durante 24 h, evitando la exposición a la luz natural con el recubrimiento de las muestras con papel aluminio. La materia orgánica (MO) se determinó por incineración a 600 °C durante 12 h, el nitrógeno por el método Kjeldahl-N, la fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) según lo descrito por Weizhong y Udén (1998).

### Prueba de degradabilidad *in vitro* con líquido ruminal

#### Animales y obtención de líquido ruminal

Se utilizaron tres bovinos machos Holstein con un peso vivo de 300 ± 7.6 kg, provistos con fistula ruminal. Los animales se alojaron en un corral de 30 m<sup>2</sup> con piso de concreto, la dieta de estos ofrecida fue basada en una proporción 30% forraje y 70% concentrado, agua al libre acceso y dos horarios de alimentación a las 08:00 y 16:00 h. El protocolo de

manejo de los animales se realizó de acuerdo a lo establecido en el Reglamento de uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el CP.

Se extrajeron 2 L de líquido ruminal (LR) con una bomba de vacío. Cada muestreo de LR se decantó manualmente a otro recipiente con el fin de eliminar las partículas grandes de alimento y se conservó en un termo a 39 °C. Posteriormente en el laboratorio se filtró el LR con una malla de tela de 0.05 mm y se agregaron 3 g de urea, transfiriendo el LR en matraces Erlenmeyer a 39 °C.

#### Fermentación *in vitro*

El procedimiento de las técnicas se realizó en un cuarto oscuro con luminosidad tenue (dada con un foco de 20 watts cubierto con aluminio), para evitar durante toda la fase experimental la pérdida de carotenos por exposición a la luz. El inóculo ruminal se preparó con una mezcla dos proporciones de LR y una proporción de buffer mineral (Menke *et al.* 1979) en viales de vidrio color ámbar de 120 mL. Se prepararon cinco muestras de LR sin sustrato (LRS = solo con el inóculo ruminal); a los viales se les agregó 0.5 g. de muestra de alfalfa molida y se les adicionó 40 mL de inóculo con un flujo constante de CO<sub>2</sub>, para luego colocar tapones de hule y sellarlos con arillos de aluminio, para ser colocados en incubación dentro de un baño María (Felisa<sup>®</sup>, FF372 con capacidad de 8 L) a 39 °C. El baño permaneció con movimientos oscilatorios y cubierto con un plástico negro para mantener los frascos protegidos de la luz directa durante toda la fermentación.

#### Degradabilidad de la materia seca

En cada uno de los horarios de muestreo se retiraron viales para la determinación de la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS). Los viales retirados del baño María, se colocaron por cinco minutos en congelación con la finalidad de detener la actividad microbiana y después almacenarlos en refrigeración para su conservación. El contenido de cada vial se colocó dentro de un tubo plástico para centrifuga (Labcon<sup>®</sup> North America de 50 mL) previamente regulado a peso constante en una estufa (Ríos Rocha<sup>®</sup> Mod. NCF-62) a 55 °C.

Para luego identificarlas y pesarlas en una balanza analítica (OHAUS<sup>®</sup> mod. GA200) y posteriormente centrifugar (centrifuga, Beckman<sup>®</sup> J2-H3) a 11 180 g, por 10 min. El vial se enjuagó con agua destilada hasta coleccionar todas las partículas de la muestra a través de diferentes pasos de centrifugación. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y los tubos con la MS se introdujeron en una estufa de aire forzado (Ríos Rocha<sup>®</sup> Mod. NCF-62) a 55°C durante tres días, con la finalidad de eliminar la humedad en su totalidad y determinar la MS residual.

### Medición de carotenos totales

Las muestras de alfalfa en día cero, muestras incubadas a diferentes tiempos y muestras de LRS, se usaron para medir el contenido total de carotenos. El procedimiento de la técnica se continuó en el cuarto oscuro (características descritas anteriormente), empleándose la modificación de medición de carotenos reportada por Bruuinsma (1963). Para lo cual se pesaron 0.5 g de alfalfa y 5 mL de LRS, éste último usado para corregir el contenido de carotenos. Las muestras se colocaron en frascos ámbar de 50 mL añadiendo 20 mL de acetona y 0.01% de una mezcla de BHA: BHT (1:1). Para luego agitar los frascos a 200 g en una incubadora de agitación orbital Lab-Line<sup>®</sup> (Melrose Park, Illinois, USA) por 3 h a temperatura ambiente. Luego las muestras se filtraron en papel Whatman 541, adicionando a los frascos 20 mL de éter de petróleo, mezclando continuamente; y dejar reposar de 5 a 10 min. Una vez que se observó separación de fases, se desechó el precipitado, repitiendo la extracción dos a tres veces y recolectando la fase superior orgánica que contenían el pigmento. La acetona se eliminó con dos o tres lavados sucesivos con agua destilada, al extracto libre de acetona se le adicionaron 10 mL de NaOH al 40%, se agitó y se eliminó la fase inferior. Posteriormente, la muestra se lavó tres veces con agua destilada hasta eliminar el NaOH, lo que se comprobó adicionando tres gotas de fenolftaleína. Nuevamente el procedimiento de lavado se hizo por tres veces con 20 mL de NaSO<sub>4</sub> al 10% y agua destilada por separado. Se extrajo la parte inferior con pipetas Pasteur, se colocó en matraces aforados de

50 mL y se aforó con acetona/éter de petróleo/agua (85:10:5, v/v/v). La cuantificación de los carotenos se realizó con un espectrofotómetro Spectronic<sup>®</sup> 20 (Milton Roy, Rochester, Estados Unidos), leyendo las muestras a 454 nm y utilizando como blanco éter de petróleo.

### Cálculos

La DIVMS se calculó con la fórmula siguiente:  $DIVMS = 1 - R - BS$ . Donde R es el peso del residuo del sustrato en gramos, B es el peso del residuo del blanco en gramos y S es el peso de la MS del sustrato inicial.

Para la determinación de los carotenos totales se empleó un espectrofotómetro Spectronic<sup>®</sup> 20 (Milton Roy, Rochester, Estados Unidos), en que las muestras se leyeron a 454 nm utilizando como blanco éter de petróleo. La cantidad de carotenoides totales en la muestra se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$Carotenos\ totales = \frac{(A)(FD)(V)(3.85)}{(peso)(alícuota)} \times 100$$

Dónde: A - Absorbancia a 454 nm, V - Volumen total de la muestra, Peso - Peso de la muestra, Alícuota - 1 mL de muestra, FD - Factor de dilución 3.85 - Factor de conversión (Valor obtenido de 250 muestras analizadas para carotenoides).

### Análisis Estadístico

Las pruebas de degradabilidad y degradación de los carotenos totales se clasificaron como bloques aleatorizados con base al tiempo de incubación (0, 12, 24, 48 y 72 h), con 6 repeticiones por bloque. El modelo estadístico para las variables analizadas fue el siguiente:  $Y_{ij} = \mu + \beta_i + \epsilon_{ij}$

Dónde:  $Y_{ij}$  = valor de cada observación individual para la variable dependiente,  $\mu$  = promedio general,  $\beta_i$  = efecto de i horas de incubación, y  $\epsilon_{ij}$  = error aleatorio residual.

Se realizó un análisis de varianza y comparación múltiple de las medias de pruebas de Tukey, a un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Un análisis de regresión y correlación para determinar la  $r^2$  más alta. Todos los cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS Ver. 21.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis químico y degradación de la materia seca en la alfalfa

Los porcentajes de MS, MO y cenizas en las muestras de alfalfa fueron similares a lo reportado en la literatura. En el caso del contenido de PC varía por la región y la época del año (Rojas *et al.* 2019), reportándose valores desde 22.5 (Lerma *et al.* 2020) hasta 23.8 (Vázquez *et al.* 2010), con diferencias estrechas entre algunas variedades, por ejemplo, las var. Moapa-69, SW-8718, SW-8210, Cuf-101 oscilan los rangos desde 20.0 hasta 21.5% de PC en la época de primavera (Capacho *et al.* 2018). Los contenidos de fibras en las alfalfas oscilan entre los rangos de FDA: 28.6 - 40.0% y FDN: 33.7 - 56.0% (Vázquez *et al.* 2010), con diferencias amplias entre algunas variedades: Cuf-101: 33.1% de FDA y 47.0% de FDN; variedad Júpiter: 34.3% de FDA y 48.5% de FDN; variedad Moapa: 33.3% de FDA y 47.9% de FDN, en primavera (Capacho *et al.* 2018). Con respecto, al contenido de carotenos totales en la alfalfa, en este estudio se cuantificaron 257 mg g MS<sup>-1</sup>, lo cual coincide con la información reportada en otros trabajos en donde se han cuantificado cantidades entre 200 y 500 mg g MS<sup>-1</sup>, dichas cantidades van a depender de diversos factores como se han mencionado anteriormente.

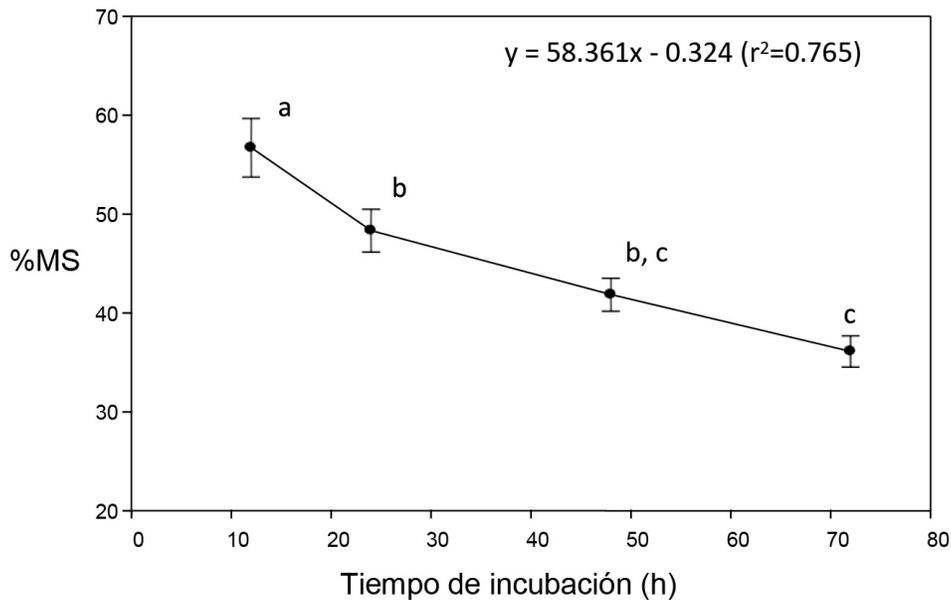
La tasa de degradación de la MS en la alfalfa, fue alta durante las primeras 24 h (Figura 1), esta respuesta se debe a que el contenido celular de la alfalfa es altamente digestible y el contenido de celulosa y hemicelulosa son bajos (Cruz *et al.* 2011). En un estudio similar, Contreras *et al.* (2019) reportan una degradación de la alfalfa en 42% a las 24 h con evaluaciones *in situ*. En el caso de los forrajes tropicales, la degradabilidad ruminal de la MS es mayor y oscila entre 53 a 63%, aunque depende del grado de maduración del forraje (Arthington y Brown 2005). Como es sabido, la ventaja de la alfalfa en términos de alta degradabilidad, se debe a su contenido en azúcares disponibles, las paredes celulares y a la velocidad de degradación (Andrighetto *et al.* 1993) dada también por la edad de rebrote; un estudio realizado por Boschini y Chacón (2017) repor-

taron degradabilidad de MS en 80% cuando la edad de rebrote de la alfalfa fue de 28 días, mientras con 63 días post rebrote la degradabilidad fue de 65%. Dentro del contenido químico que compone a la alfalfa, la proteína se degrada más rápidamente en el rumen (Elizalde *et al.* 1999) reportándose valores de 55% en incubación ruminal de 0-6 h en alfalfas jóvenes (Valderrama *et al.* 2011).

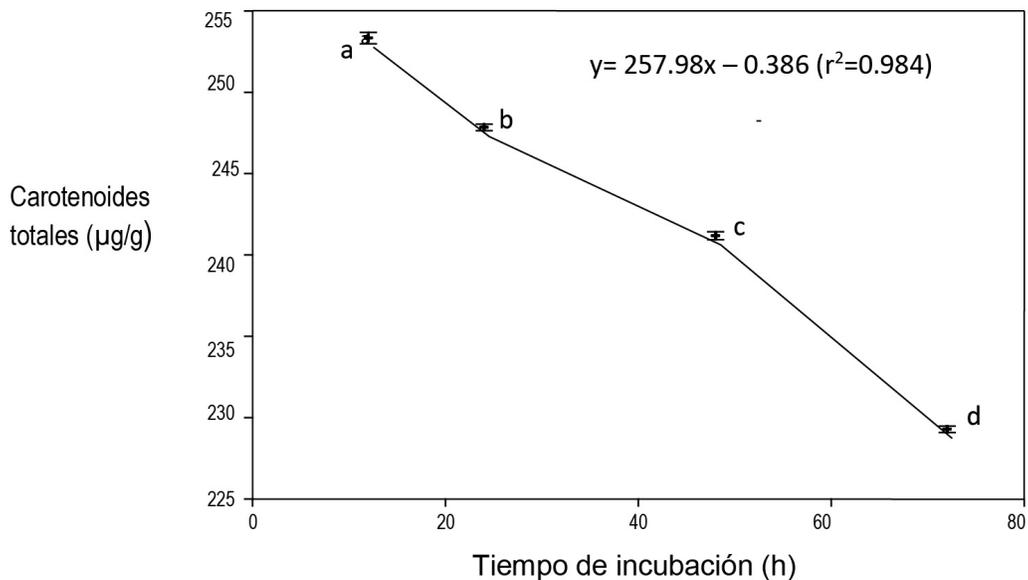
Así mismo, la madurez se asocia con el incremento de la FDN y la lignificación (Yari *et al.* 2011) ocasionándose aumento en la fracción indigestible del forraje observándose una interacción negativa entre la madurez y el valor nutritivo de los forrajes (Yu *et al.* 2004). Algunos forrajes tropicales se degradan ampliamente en el rumen, y pueden compararse con la alfalfa, por ejemplo, se reportan datos de degradación de la MS en forrajes como *Cynodon plectostachyus* con 45%, *Guazuma ulmifolia* 50%, *Leucaena leucocephala* 80% y *Gliricidia Sepium* el 52% a las 24 h de incubación en el rumen de ovinos (Flores *et al.* 2011). Como se citó anteriormente, el contenido de proteína se asocia con la degradabilidad, en este estudio no se cuantificó la degradación de la proteína; sin embargo, la alfalfa evaluada contenía el 20% de proteína. Se ha reportado que la tasa de degradación está relacionada con el contenido de MS, PC, contenido de paredes celulares, proporción de celulosa, hemicelulosa y lignina, principalmente (Contreras *et al.* 2019). Si el contenido de PC es mayor, la degradación ocurre durante las primeras 6 h de incubación (Valderrama *et al.* 2011).

### Degradación de carotenos totales de alfalfa

La mayor degradación de carotenos se cuantificó en las primeras horas de incubación del forraje (Figura 2), lo cual coincide con otro trabajo donde se reportan desapariciones de carotenos de 57- 65 y 65 -67% en líquido ruminal de toros y cabras respectivamente, durante las primeras horas de incubación del forraje, concluyendo una asociación entre la MS y el contenido celular (Mora *et al.* 1999). De igual manera en otro estudio realizado se reporta la degradación de MS y degradación de carotenos del pasto estrella (*Cynodon Plectostachyus*) durante las primeras 12 h en becerros canulados (Cruz *et al.* 2011).



**Figura 1.** Desaparición de Materia seca *in vitro* de alfalfa (*Medicago Sativa*). Letras diferentes muestran diferencia en horas de incubación ( $P < 0.05$ ).



**Figura 2.** Desaparición de carotenoides totales de alfalfa (*Medicago Sativa*). Letras diferentes muestran diferencia en horas de incubación ( $P < 0.05$ ).

Los primeros estudios realizados *in situ* con bovinos reportan la degradación de  $\beta$ -caroteno desde 20 hasta 30% en las primeras horas de incubación (4 a 16 h) del forraje (Keating *et al.* 1964). Mientras que Rode *et al.* (1990) realizaron un estudio más de-

tallado, evaluando la degradación de vitamina A en el líquido ruminal de bovinos alimentados con concentrado, heno y pajas, y observaron que las eficiencias en esta degradación fueron de 67% a las 12 h de incubación del forraje, respectivamente, concluyendo

que se debió a la actividad de enzimas microbianas. Igualmente, Park (1983) concluyó que son las enzimas microbianas las que actuaban por medio de reacciones de reducción sobre las dobles ligaduras, tanto de la vitamina A como de los carotenos, promoviendo una reacción de biohidrogenación. Sin embargo, otros estudios *in vitro* e *in vivo* como los realizados por Dawson y Hemington (1974) y Mora *et al.* (1999) demostraron que el  $\beta$ -caroteno no es destruido por los microorganismos del rumen. Las diferencias en la degradación de los carotenos en el rumen pueden deberse a las características de la población microbiana, que están influenciadas por la dieta o el pastoreo (Rode *et al.* 1990). Al respecto, Cardinault *et al.* (2006) afirmaron que el rumen puede tener una función crucial en el metabolismo de los carotenos, debido a resultados que obtuvieron en un trabajo realizado en borregos, en donde cuantificaron la tasa de degradación de luteína, epiluteína, y 13-cis- $\beta$ -caroteno, observándose un comportamiento diferente para cada carotenoide individual. Hasta ahora, la mayoría de los datos disponibles sobre la degradación de los carotenos en el rumen se refieren en específico al  $\beta$ -caroteno, pero hace falta investigar que sucede con otro tipo de carotenos. Se han publicado resultados sobre la digestibilidad aparente de los carotenos. Algunos autores informaron de una digestibilidad aparente baja de 15% en los carotenos de ovejas o vacas que recibieron fuentes naturales o sintéticas de carotenos (Kumar *et al.* 1981). Pero otros estudios han demostrado una digestibilidad aparente más alta (55%) del caroteno en las primeras 12 h de incubación (Mora *et al.* 2001). La ausencia de efectos claros de las fuentes o cantidades de carotenos ingeridos puede explicar la divergencia en los resultados entre los estudios. En general, la concentración de carotenos totales y la digestión se regulan por el exceso de madurez y el grado de lignificación del forraje (Dunne *et al.* 2009).

El tiempo de incubación del forraje es un factor importante que contribuye a la variación en la biodisponibilidad de los carotenos; en un trabajo realizado por Cruz *et al.* (2011) en muestras de forraje que se incubaron, solamente 53.2% de los carotenos desapareció y 46.8% se excretó en la materia fecal. Posteriormente, al incubar el pasto Estrella de 12 a 72 h, los carotenos desaparecieron progresivamente en el rumen y en el intestino delgado. Los resultados hacen suponer una degradación por parte de microorganismos del rumen a la MS en consecuencia, ocurre mayor degradación de los carotenos. Esto ocasionó que se alcanzara una tasa de degradación de carotenos en 93.4%, cuando las bolsas fueron incubadas por 72 h (Cruz *et al.* 2011). Posiblemente ocurrió un cambio químico de los carotenos en el rumen relacionado con reacciones de hidrogenación, sin llegar a una saturación de las dobles ligaduras (Prieto-Manrique *et al.* 2016). A mayores tiempos de incubación de la muestra en el rumen, es posible que la digestión del material celulósico permitiera la liberación de mayores cantidades de carotenos en el medio; por tanto, se retuvieron menos en las muestras del forraje.

La prueba *in vitro* realizada en este estudio, indica que la degradación de los carotenos de la alfalfa, desaparecen rápidamente en las primeras horas de incubación de la muestra, al mismo ritmo que se va degradando la MS. El estudio realizado *in vitro*, permitió obtener una simulación muy parecida a lo que sucede en el rumen de los bovinos, por lo que se concluye que el contenido de carotenos presentes en la alfalfa desaparece rápidamente en el rumen, existiendo la posibilidad que algunos de estos lleguen hasta el intestino para que algunos de ellos pasen a la forma activa de vitamina A y otros más se absorban en intestino pigmentando la carne o leche.

## LITERATURA CITADA

- Andrighetto I, Bailoni L, Cozzi G, Tolosa HF, Hartman B, Hinds M, Sapienza D (1993) Observations on *in situ* degradation of forage cell components in alfalfa and Italian ryegrass. *Journal of Dairy Science* 76: 2624-2631.

- Arthington JD, Brown WF (2005) Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. *Journal of Animal Science* 83: 1726-1731.
- Boschini FC, Chacón HP (2017) Degradabilidad ruminal de la alfalfa en la zona oriental del Valle Central de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 28: 657-666.
- Brenes SA (2014) Los carotenoides dietéticos en el organismo animal. *Nutrición Animal Tropical* 8: 21-29.
- Bruuinsma J (1963) The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochemistry and photobiology* 2: 241-249.
- Capacho MA, Flórez DD, Hoyos PJ (2018) Biomasa y calidad nutricional de cuatro variedades de alfalfa para introducir en Pamplona, Colombia. *Ciencia y Agricultura* 15: 61-67.
- Cardinault N, Doreau M, Poncet C, Nozière P (2006) Digestion and absorption of carotenoids in sheep given fresh red clover. *Animal Science* 82: 49-55.
- Carranco JM, Calvo CM, Pérez GR (2011) Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 61: 233-241.
- Ciappini MC, Stoppani FS, Martinet R, Alvarez MB (2015) Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología* 19: 45-51.
- Contreras JL, Pariona J, Cordero A, Jurado M, Huamán R (2019) Degradabilidad ruminal de forrajes y alimentos concentrados y estimación del consumo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 30: 1481-1493.
- Cruz MRG, Ramírez BJE, Guerrero LMI, Hernández MO (2011) Digestión de carotenoides en pasto estrella africano (*Cynodon plectostachyus*) determinada con técnicas *in situ* en ganado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 1011-1017.
- Dawson RMC, Hemington N (1974) Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. *British Journal of Nutrition* 32: 327-340.
- Dunne PG, Monahan FJ, O'mara FP, Moloney AP (2009) Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat science* 81: 28-45.
- Elizalde JC, Merchen NR, Faulkner DB (1999) *In situ* dry matter and crude protein degradation of fresh forages during the spring growth. *Journal of dairy science* 82: 1978-1990.
- Flores FI, Tinajero JJM, Ferrer JGO, Cruz SP, Castillo CGG, Velasco HL, Priego GM (2011) Digestibilidad *in situ* de la materia seca de hojas de árboles multipropósito y pasto estrella (*cynodon plectostachyus*) en ovejas. *Quehacer Científico en Chiapas* 1: 27-35.
- Flores MG, Sawers RJH, Aguilar GR, Frier JD, Tiessen A (2015) Contenido de carotenoides del grano de maíz híbrido cultivado en invernadero. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 3: 1-9.
- García FM (2015) Contenido de carotenoides del grano de maíz híbrido cultivado en invernadero. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 3: 1-9.
- Ilieva A, Vasileva V (2013) Effect of mineral fertilization and manure on some characteristics in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *World Applied Sciences Journal* 26: 630-635.
- Keating EK, Hale WH, Hubbert JRF (1964) *in vitro* degradation of vitamin A and carotene by rumen liquor. *Journal of Animal Science* 23: 111-117.
- Kumar MNA, Sundareshan K, Sampath SR (1981) Effect of feeding varying quantities of forages on vitamin A content of blood and milk of cows. *Indian Journal of Animal Science* 51: 21-25.

- Larsen MK, Fretté XC, Kristensen T, Eriksen J, Soegaard K, Nielsen JH (2012) Fatty acid, tocopherol and carotenoid content in herbage and milk affected by sward composition and season of grazing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2891-2898.
- Lerma LJJ, Zapata MJJ, Chañag MHA, Meneses BDH, Ruiz EH, Ojeda JH, Castro RE (2020) Efecto de enmiendas calcáreas en la productividad y la calidad de *Medicago sativa* (L.) en Colombia. *Pastos y Forrajes* 43: 190-200.
- Lobón AS, Blanco AM, Sanz P., Rufino MPJ, Molino GF, Joy TM (2015) Influencia del pastoreo de alfalfa o esparceta sobre los parámetros productivos y reproductivos de ovejas y corderos. *Pastos* 45: 36-46.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979) The estimation of digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agriculture Science* 93: 217-222
- Moore KJ, Moser LE, Vogel KP, Waller SS, Johnson BE, Pedersen JF (1991) Describing and quantifying growth stages of perennial forage grasses. *Agronomy Journal* 83: 1073-1077.
- Mora O, Romano JL, González E, Ruiz FJ, Shimada A (1999) *In vitro* and *in situ* disappearance of  $\beta$ -carotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 273-276.
- Namitha KK, Negi PS (2010) Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50: 728-760.
- Ordóñez TC, Rodríguez E (2013) Frutos tropicales como fuente de carotenoides: biosíntesis, composición, biodisponibilidad y efectos del procesamiento. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 4: 001-023.
- Park YW, Anderson MJ, Walters JL, Mahoney AW (1983) Effects of processing methods and agronomic variables on carotene contents in forages and predicting carotene in alfalfa hay with near-infrared-reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 66: 235-245.
- Prieto-Manrique E, Mahecha-Ledesma L, Angulo-Arizala J, Vargas-Sánchez JE (2016) Efecto de la suplementación lipídica sobre ácidos grasos en leche de vaca, énfasis en ácido ruménico. *Agronomía Mesoamericana* 27: 421-437.
- Reynoso CR, Mora O, Nieves V, Shimada A, González ME (2004)  $\beta$ -Carotene and lutein in forage and bovine adipose tissue in two tropical regions of Mexico. *Animal Feed Science and Technology* 113: 183-190.
- Rode LM, McAllister TA, Cheng KJ (1990) Microbial degradation of vitamin A in rumen fluid from steers fed concentrate, hay or straw diets. *Canadian Journal of Animal Science* 70: 227-233.
- Rojas GAR, Mendoza PSI, Maldonado PM, Álvarez VP, Torres SN, Cruz HA (2019) Rendimiento de forraje y valor nutritivo de alfalfa a diferentes intervalos de corte. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10: 849-858.
- SPSS (2020) IBM SPSS Statistics Version 21. SPSS Inc, Chicago, IL.
- Takaichi S, Murakami A, Mochimari M, Yokoyama A (2012)  $\alpha$ -Carotene and its derivatives have a sole chirality in phototrophic organisms. *Acta Biochimica Polonica* 59: 159-161.
- Valderrama XL, Anrique RG (2011) *In situ* rumen degradation kinetics of high-protein forage crops in temperate climates. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71: 572-577.
- Vázquez VC, García HJL, Salazar SE, Murillo AB, Orona CI, Zúñiga TR, Preciado RP (2010) Rendimiento y valor nutritivo de forraje de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con diferentes dosis de estiércol bovino. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1: 363-372.

- Weizhong C, Udén P (1998) An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fiber. *Animal Feed Science and Technology* 74: 281-288.
- Yari M, Valizadeh R, Naserian AA, Jonker A, Yu P (2012) Modeling nutrient availability of alfalfa hay harvested at three stages of maturity and in the afternoon and morning in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 178: 12-19.
- Yu P, Christensen DA, McKinnon JJ (2004) *In situ* rumen degradation kinetics of timothy and alfalfa as affected by cultivar and stage of maturity. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 255-263.