

EVALUACION DE LA LUTEINA COMO INDICADOR PARA
ESTIMAR EL CONSUMO DE FORRAJES

Tesis de Grado de Magister Scientiae

Carlos U. León Velarde R.



INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA
Centro Tropical de Enseñanza e Investigación
Departamento de Ganadería Tropical
Turrialba, Costa Rica
Abril, 1972

EVALUACION DE LA LUTEINA COMO INDICADOR PARA
ESTIMAR EL CONSUMO DE FORRAJES

Tesis

Sometida al Consejo de Estudios Graduados como
requisito parcial para optar el grado de

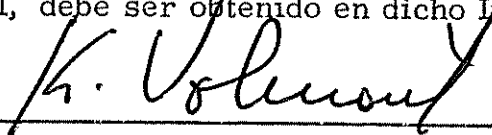
Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

Permiso para su publicación, reproducción total o
parcial, debe ser obtenido en dicho Instituto

APROBADA:



Consejero

Karel Vohnout, Ph. D.



Comité

Manuel Ruiz, Ph. D.



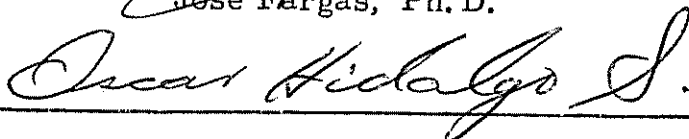
Comité

Oliver Deaton, Ph. D.



Comité

José Fargas, Ph. D.



Comité

Oscar Hidalgo-Salvatierra, Ph. D.

Marzo, 1972

DEDICATORIA

A mis Familiares

AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su agradecimiento:

Al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A., Centro Tropical de Enseñanza e Investigación, por haber hecho posible sus estudios de post-grado.

Al Dr. Karel Vohnout, Consejero Principal, por su valiosa colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

A los Drs. José Fargas, Manuel Ruiz, Oliver Deaton y Oscar Hidalgo, miembros del Comité Consejero, por la colaboración prestada.

Al Dr. Héctor Muñoz, Jefe del Departamento de Ganadería Tropical, por la facilidades y oportunidades brindadas.

Al Departamento de Cultivos y Suelos Tropicales, Laboratorio de Fisiología Vegetal del CTEI, por las facilidades en el equipo necesario para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Raúl Soikes, Especialista en Educación de la Zona Andina, por su estímulo y ayuda brindada en su perfeccionamiento profesional.

BIOGRAFIA

El autor nació en Iquitos, Departamento de Loreto, Perú, el 1 de mayo de 1947. Realizó sus estudios primarios en el Colegio San Agustín, completando los estudios en el Colegio Militar Leóncio Prado.

Cursó sus estudios universitarios en la Universidad Nacional Agraria La Molina, donde obtuvo el título de Ingeniero Zootecnista en diciembre de 1969. En enero de 1970 ingresó como docente contratado a la Universidad Nacional Agraria, La Molina, destacado al Departamento de Nutrición en el Programa Interrelación Suelo-Planta-Animal.

En setiembre de 1970 ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A., en Turrialba, Costa Rica, para realizar estudios de postgrado en el Departamento de Ganadería Tropical, egresando en marzo de 1972.

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE CUADROS..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| ABREVIATURAS DEL TEXTO | xi |
| 1. INTRODUCCION..... | 1 |
| 2. REVISION DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. Métodos para determinar el consumo de forrajes..... | 3 |
| 2.2. Principales indicadores en el consumo de forrajes..... | 4 |
| 2.3. La luteína..... | 5 |
| 3. MATERIALES Y METODOS..... | 8 |
| 3.1. Analisis de laboratorio..... | 9 |
| 3.1.1. Preparación de placas..... | 9 |
| 3.1.2. Disolvente para la separación..... | 10 |
| 3.1.3. Extracción de pigmentos..... | 10 |
| 3.1.4. Separación de la luteína..... | 10 |
| 3.1.5. Análisis cuantitativo de la luteína..... | 11 |
| 3.2. Análisis estadístico y planteamiento matemático..... | 11 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION..... | 13 |
| 4.1. Metodología..... | 13 |
| 4.1.1. Extracción de pigmentos..... | 13 |
| 4.1.2. Cromatograma..... | 13 |
| 4.1.3. Curva de absorción..... | 15 |
| 4.1.4. Recuperación de la luteína..... | 17 |
| 4.2. Evaluación de la luteína como indicador..... | 19 |
| 4.2.1. Precisión del método..... | 19 |

| | Página |
|--|--------|
| 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 25 |
| 6. RESUMEN..... | 26 |
| 6a. SUMMARY..... | 28 |
| 7. LITERATURA CITADA..... | 30 |
| APENDICE..... | 36 |

LISTA DE CUADROS

TEXTO

| Cuadro No. | | Página |
|------------|---|--------|
| 1 | Valores de R_f de luteína..... | 15 |
| 2 | Consumo de materia seca estimada usando luteína como indicador..... | 19 |
| 3 | Análisis de variancia para MSC estimada..... | 20 |
| 4 | Coefficientes de regresión para el cálculo de MSC predecida, usando luteína como indicador..... | 21 |
| 5 | Comparación entre MSC medida, MSC estimada y MSC predecida por el método de relación, usando luteína como indicador. Valores para cada pasto... | 22 |
| 6 | Comparación entre MSC medida, MSC estimada y MSC predecida por el método de relación usando luteína como indicador. Valores para cada edad.... | 23 |

APENDICE

| Cuadro No. | | Página |
|------------|---|--------|
| 1 | Análisis de variancia para MSC medida..... | 39 |
| 2 | Análisis de variancia para MSC medida de cada pasto, usando luteína como indicador..... | 40 |
| 3 | Coefficientes de regresión para el cálculo de MSC predecida para cada pasto, usando luteína como indicador..... | 41 |
| 4 | Análisis de variancia para MSC medida para cada edad, usando luteína como indicador..... | 41 |
| 5 | Coefficientes de regresión para el cálculo de MSC predecida para edades, usando luteína como indicador..... | 42 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura No. | | Página |
|------------|---|--------|
| 1 | Curva de absorción de la luteína..... | 14 |
| 2 | Promedio y error standar de recuperación de la luteína, por pastos..... | 16 |
| 3 | Promedio y error standar de recuperación de la luteína, por edades..... | 18 |

ABREVIATURAS DEL TEXTO

- A_f : Densidad óptica de luteína fecal
- A_r : Densidad óptica de luteína del pasto rechazado
- A_o : Densidad óptica de luteína del pasto ofrecido
- C. M. : Cuadrado medio
- CLC : Concentración de luteína consumida
- CLO : Concentración de luteína del pasto ofrecido
- CLR : Concentración de luteína del pasto rechazado
- CLF : Concentración de luteína fecal
- CIC : Concentración del indicador consumido
- CIF : Concentración del indicador fecal
- CIR : Concentración del indicador rechazado
- CIO : Concentración del indicador ofrecido
- C. V. : Coeficiente de variabilidad
- F. V. : Fuente de variación
- G. L. : Grados de libertad
- MS : Materia seca
- MSC : Materia seca consumida
- MSF : Materia seca fecal
- R_f : Relación entre distancia recorrida por la luteína y el
solvente
- r^2 : Coeficiente de determinación
- ULO : Unidades de luteína ofrecida
- ULR : Unidades de luteína rechazada

1. INTRODUCCION

La necesidad de una mayor producción del ganado ya sea en leche, carne o lana se encuentra ligada a que los animales reciban sustancialmente una alimentación adecuada durante su vida productiva. Siendo los pastos la fuente más barata para proporcionar nutrientes al animal, es indispensable el obtener una adecuada evaluación de los mismos. La forma de evaluación más eficiente sería la medición de la energía neta, pero esto es difícil de realizar especialmente con animales en pastoreo. Como alternativa para la evaluación de los forrajes se tiene la medición del consumo y la digestibilidad.

Para la estimación del consumo y digestibilidad de los pastos existen diferentes técnicas que pueden ser clasificadas como directas o indirectas. El método convencional se basa en el registro directo del consumo, requiriéndose medir lo excretado para determinar su digestibilidad. En esta técnica es necesario mantener los animales estabulados, en jaulas metabólicas o corrales individuales, es decir bajo condiciones muy diferentes a las existentes en el sistema de pastoreo. Con los métodos indirectos es necesario la presencia de indicadores, sean estos externos o internos. El uso de indicadores internos involucra sustancias presentes en el forraje tales como lignina, sílice o pigmentos vegetales. Sin embargo, esta metodología no está aún suficientemente perfeccionada; por ejemplo, la utilización de los pigmentos como indicadores ocasiona errores en la estimación del consumo, ya que algunos son degradados a través del tracto digestivo.

Por consiguiente, encontrar un pigmento que no sufra alteraciones digestivas permitiría una estimación más precisa del consumo y digestibilidad de los pastos.

El presente trabajo tuvo como objetivos:

- 1) Evaluar la luteína como indicador para determinar el consumo y digestibilidad de la materia seca.
- 2) Desarrollar ecuaciones de predicción para estimar el consumo de la materia seca.
- 3) Evaluar los posibles factores que afectan la precisión del método.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Métodos para determinar el consumo de forrajes

El consumo de forrajes puede ser determinado de manera directa o indirecta (43); presentando cada técnica ventajas y desventajas en su utilización (61).

El método directo o de la diferencia puede ser usado con animales en pastoreo y en estabulación (54). Su uso en estabulación es a base de pesos del forraje ofrecido y rechazado, requiriendo esta técnica corrales individuales. Sin embargo, los valores obtenidos no son aplicables a las condiciones de pastoreo (2, 43). El uso del método por diferencia en pastoreo implica la estimación de la cantidad de forraje presente en un potrero antes y después de ingresar los animales (54). Hay diversos enfoques, en algunos casos se utiliza jaulas para que protejan una determinada área de pastoreo (40). Si bien su uso es relativamente de bajo costo y de fácil realización, presenta errores que se ocasionan por efecto de la selectividad que hacen los animales en el consumo del forraje y pérdidas por pisoteo (33). Los resultados que se obtienen de esta manera son un 25-40% mayores que el consumo verdadero (2).

Los métodos indirectos, posibles de ser usados en pastoreo y estabulación, están basados en la utilización de indicadores, pudiendo ser estos internos o externos (2, 61). Indicadores internos son aquellos que involucran sustancias propias del forraje, siendo los externos aquellos que se administran al animal y que no son parte del forraje (43). Ambos tipos pueden ser usados para medir el consumo de materia seca siguiendo la técnica de relación o de índices fecales (2, 45, 53, 68).

La técnica de relación o de proporciones se basa en que la cantidad de indicador consumido debe ser la misma al excretarse (2). Para obtener muestras del forraje consumido se utiliza animales con fístula ruminal o esofágica (35, 66). La producción fecal de los animales experimentales se puede medir mediante bolsas colectoras o por medio de indicadores externos (43). Las fuentes de error en esta técnica están en la selectividad de los animales fístulados, que no son los mismos que los animales usados para determinar la producción fecal (2, 35).

En el método de índices fecales se usa la concentración del indicador en las heces para obtener ecuaciones empíricas y poder predecir a partir de este parámetro el consumo (54). Los indicadores de mayor uso en esta técnica son de óxido crómico como indicador externo y los cromógenos como indicador interno (2, 25, 45, 52, 61). Esta técnica tolera que el indicador cambie parcialmente a través del tracto digestivo, ya que los valores de consumo son estimados mediante ecuaciones empíricas (14, 17, 21, 37, 43). La utilización de esta técnica se limita a situaciones locales y la extrapolación de las ecuaciones no presenta adecuada repetibilidad de los resultados (50).

2.2. Principales indicadores en el consumo de forrajes.

Los pigmentos vegetales extraídos con acetona al 85% fueron denominados cromógenos (7, 30, 55, 56, 63). La base de esta técnica es la transformación de clorofila a feofitina, siendo necesario la oxalatación de pasto para lograr este cambio (8, 12, 26).

Los cromógenos implican todos los pigmentos solubles en éter (44, 62), siendo algunos de ellos aprovechados por el organismo como el caso del

caroteno (1, 44). Además la luz visible y el tiempo de reposo afecta a los extractos reflejándose esto como una fuente de error en el método (27, 29).

El óxido crómico como indicador externo es utilizado sobre todo en la estimación de la producción fecal (9, 26, 27, 49). Se usa también en el cálculo de materia seca consumida en estabulación (67). Su mayor problema radica en que debido a su densidad presenta una distribución heterogénea a través del tracto digestivo (46). Esto ocasiona variaciones en las concentraciones del indicador en las muestras a obtener (38, 39, 54, 65).

Otras sustancias utilizadas como indicadores para estimar el consumo de materia seca son: cobre, magnesio, sílice (42), fibra cruda (53), nitrógeno fecal (9, 20, 29, 47), lignina (11, 66), fracción soluble de las heces (36, 48), extractos de pigmentos en etanol-benceno (59) y methoxyl (57, 58). Algunas de estas sustancias son parcialmente digeridas por los microorganismos del rumen (15, 43). En el caso de la lignina su determinación es particularmente laboriosa (65). El uso de sílice presenta problemas similares al óxido crómico y además puede existir contaminación del suelo (28, 42). Parece que la utilización del nitrógeno fecal es el método más adecuado dentro de este grupo, sobre todo en la técnica de índices fecales (3, 24, 32, 37).

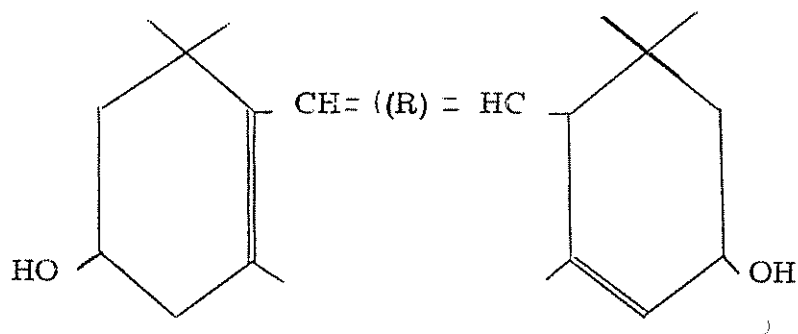
2.3. La Luteína

La luteína es un pigmento vegetal que se encuentra distribuido mayormente en los cloroplastos (6, 19, 44). Participa junto con la clorofila en el proceso fotosintético (5, 10, 19). Pertenece al grupo de las xantofilas conjuntamente con la violoxantina, cryptoxantina, zeaxantina y neoxantina principalmente, totalizando según Bickoff et al. (4) un 40% y según Livingston et al. (41) un 60% de ellas. En los pigmentos de pastos y heces al utilizarlos

como indicadores, se encuentran involucrados según Smart (60): clorofila a, clorofila b, luteína, violoxantina y β caroteno. Bickoff et al. (4) separa en alfalfa deshidratada, mediante cromatografía, un total de 40 bandas de xantofilas donde la luteína, violoxantina, cryptoxantina, zeaxantina y neoxantina representan el 87% del total de ellas; la luteína representó el 35,3% del total.

Debido a que es el pigmento que se encuentra en mayor cantidad dentro de las xantofilas también se le conoce bajo el nombre de xantofila y es parte de pigmentantes usados en la industria avícola (16).

La luteína tiene como nombre químico 3', 3' dihidroxi α -caroteno ($C_{40} H_{56} O_2$), (6):



donde $R = C_{20} H_{24}$. El peso molecular es 568,55 y el punto de fusión $190^{\circ}C$. Se presenta como cristales amarillos, insoluble en agua y soluble en éter, acetona, alcohol y otros solventes orgánicos (13, 34). En espectrofotometría cuando el solvente es etanol se presenta la mayor absorbancia a $446,5 \mu$, presentando diferencias de acuerdo al solvente utilizado (69). En cromatografía de capa fina con placas impregnadas con tierra sílice se reportan valores de R_f de 0,56 (13, 51).

Estudios preliminares de análisis de muestras secas de pastos y heces, mediante cromatografía, mostraron una elevada recuperación de la luteína. Esto hizo pensar en la posibilidad de usar la luteína como un indicador que pudiera comportarse más adecuadamente que los cromógenos (Carmargo, C. y Vohnout, K. ^{1/}).

^{1/} Comunicación personal. Estudiante graduado y profesor del CTEI respectivamente. 1971.

3. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se llevó a cabo en la estación experimental y laboratorios del Centro Tropical de Enseñanza e Investigación del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A., en Turrialba, Costa Rica. Turrialba se encuentra en una zona tropical a 600 m de altitud, con una temperatura media anual de 22°C y aproximadamente 3.000 mm de precipitación anual con una humedad relativa promedio de 90%.

Se utilizaron muestras compuestas provenientes de 18 pruebas de consumo y digestibilidad por colección total, correspondiente a 6 gramíneas tropicales en etapas de crecimiento de 4, 8 y 12 semanas:

| | |
|-----------|-----------------------------------|
| Elefante | (<u>Pennisetum purpureum</u>) |
| Pangola | (<u>Digitaria decumbens</u>) |
| Pará | (<u>Brachiaria mutica</u>) |
| Alemán | (<u>Echynocloa polystachia</u>) |
| Gramalote | (<u>Paspalum fasciculatum</u>) |
| Guinea | (<u>Panicum maximum</u>) |

Estos pastos previamente picados fueron ofrecidos ad libitum a los animales 2 veces por día, durante 15 días. Los primeros 8 días sirvieron para habituar los animales al consumo del forraje, midiéndose dicho consumo de los días 8 a 12. De los días 10 a 15 se midió la producción fecal, la misma que se realizó por colección total usando bolsas colectoras. Para el análisis de laboratorio se tomaron muestras 3 veces por día de las bolsas colectoras, las mismas que se juntaron para obtener las muestras compuestas de cada animal.

Los animales utilizados fueron 72 hembras pertenecientes a las razas Criollo, Jersey y Criollo x Jersey con pesos entre 150 Kg y 450 Kg (64).

3.1. Análisis de laboratorio

De las muestras del pasto ofrecido, del pasto no consumido y de las heces de cada animal se separó la luteína por medio de la técnica de cromatografía en capa fina descrito por Hager y Meyer-Bertenrath (22, 23), siendo modificada en parte debido a trabajar con material seco; lo que imposibilitó la aparición clara de otros pigmentos. La luteína fue sometida a un análisis cuantitativo mediante espectrofotometría.

3.1.1. Preparación de placas

a) Se pesaron juntos:

12 g de tierra sílice (Fischer I-22) pasada por un tamiz malla 60

3 g de sílica gel 0,08 mm (E. Merck No. 7729)

3 g de carbonato de calcio (Fischer No. C-62)

0,02 g de hidróxido de calcio (Fischer No. C-97)

b) Se midieron 60 ml de una solución de ácido ascórbico ($5 \times 10^{-3} M$), los que se mezclaron con el material adsorbente bajo agitación constante de una licuadora marca WARING BLENDOR. La masa se vertió en un aplicador de cromatografía marca UNOPLAN, tipo BP. 945,868 de la firma Shandon Scientific Co. Ltd., la que se usó para esparcir la masa sobre placas de vidrio, dándole un espesor de 0,25 mm. Las placas se dejaron secar sin moverlas durante 20 minutos. Luego para su activación se las sometió a secamiento por 2 horas, en una estufa con ventilación y a una temperatura de 50°C.

3.1.2. Disolvente para la separación

Se mezclaron 100 ml de Ligroína, con un punto de ebullición de 90 a 120°C, con 10 ml de isopropanol y 0,25 ml de agua destilada. Esta mezcla se colocó en una cámara cromatográfica de vidrio, con tapa esmerilada superpuesta, llenando el fondo hasta 1 cm de altura.

3.1.3. Extracción de pigmentos

Se pesaron 5 g de las muestras secas de pasto ofrecido, rechazado y de heces y fueron colocados en un embudo de papel de filtro (Whatman No. 1). La muestra se depositó en un aparato soxlet, con 60 ml de acetona, haciéndose la extracción a la luz del día durante 4 horas, al término de las cuales se concentró mediante evaporación hasta tener unos 15 ml de extracto. Este extracto fue llevado a un volumen de 25 ml, guardándose en refrigeración durante 2 horas, antes de ser utilizadas.

3.1.4. Separación de la luteína

El extracto de cada muestra fue analizado por duplicado, mediante cromatografía en capa fina. Se aplicó el extracto sobre la base de la placa con una pipeta de 1 ml en una franja menor de 1 cm de ancho. La aplicación se hizo a la luz y se dejó secar unos pocos segundos antes de ser colocados en la cámara cromatográfica con el solvente.

La banda de luteína presente en cada placa desarrollada fue raspada mediante una espátula y trasladada a un filtro poroso colocado sobre frascos de color ambar, que contenían conexiones para aplicar vacío. El filtrado paso a un matraz aforado de 5 ml, el mismo que estaba dentro del frasco de color ambar. Para la elución se utilizó etanol al 95%.

3.1.5. Análisis cuantitativo de la luteína

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman, modelo B. La longitud de onda específica de 446,5 mμ se determinó de acuerdo a la máxima absorbancia registrada. La absorbancia máxima del pigmento fue medida en relación a la del etanol al 95%. Los valores de densidad óptica obtenidos para la luteína del pasto y heces fueron utilizados como unidades de luteína para los respectivos cálculos de materia seca consumida estimada (Apéndice).

3.2. Análisis estadístico y planteamiento matemático

La estimación de materia seca fue determinada a partir de la siguiente relación:

$$MSC = \frac{CLF}{CLC} \times MSF \quad [1]$$

donde:

MSC = materia seca consumida estimada (Kg/día)

MSF = materia seca fecal (Kg/día)

CLF = concentración de luteína fecal en las heces

CLC = concentración de luteína en el pasto consumido

Para los consumos de materia seca estimada y consumo de materia seca medida se realizó el siguiente análisis de variancia:

| | F. V. | G. L. |
|------------------------|------------|-------|
| Pastos | | 5 |
| | Regresión | 1 |
| | Desviación | 4 |
| Edades/pastos | | 12 |
| | Regresión | 1 |
| | Desviación | 11 |
| Animales/edades/pastos | | 54 |
| | Regresión | 1 |
| | Desviación | 53 |
| Total | | 71 |
| | Regresión | 1 |
| | Desviación | 70 |

Las regresiones fueron realizadas de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y = a + b X \quad [2]$$

Donde:

Y = materia seca consumida medida (Kg/día)

X = materia seca consumida (Kg/día) estimada por la relación [1]

b = coeficiente de regresión

a = valor de Y cuando X = 0

Si el comportamiento del indicador se ajusta a la relación [1] la ecuación [2] debe presentar los valores de $a = 0$ y $b = 1$ (H_0).

Para evaluar las diferencias entre los consumos de materia seca estimada, medida y predecida se efectuaron pruebas de "t" para observaciones pareadas:

- a) MSC medida vs MSC estimada por la relación [1]
- b) MSC medida vs MSC predecida por la relación [2]

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Metodología

4.1.1. Extracción de pigmentos

Luego de ensayar varios sistemas de extracción se encontró que la extracción constante en un aparato soxlet, por 4 horas era la más conveniente. Al extraer los pigmentos en el soxlet sólo durante 2 horas, con acetona al 85% y ácido oxálico, se notó la presencia de pigmentos en los residuos de las muestras. Esto puede producir una falsa evaluación cuantitativa de la luteína y ocasionaba un revelado débil. La extracción con acetona al 100% durante 4 horas, no dejó residuos de pigmentos en las muestras y facilitó un revelado claro. Hager y Meyer-Bertenrath (22, 23) extrajeron los pigmentos por molienda del material fresco; Reid et al (55, 56) e Iturbide y Bateman (26, 27) logran la extracción de pigmentos mediante licuación del material fresco y utilización de acetona y ácido oxálico. Casmargo (9) modificó la técnica de extracción de cromógenos, utilizando un reflujo constante durante 2 horas con los mismos reactivos que Iturbide y Bateman (26).

4.1.2. Cromatograma

En los cromatogramas ya revelados se observó que la banda de mayor claridad corresponde a la luteína. Esta fue identificada por su valor de R_f y su mayor absorbancia en etanol.

En el desarrollo de placas con extractos de material seco, se notó la presencia de caroteno, clorofilas a y b, feofitinas a y b y luteína. No fue posible tener separaciones claras de las bandas de clorofila y feofitinas como los de epóxido de luteína, violoxantina y neoxantina. Hager y Meyer-Bertenrath

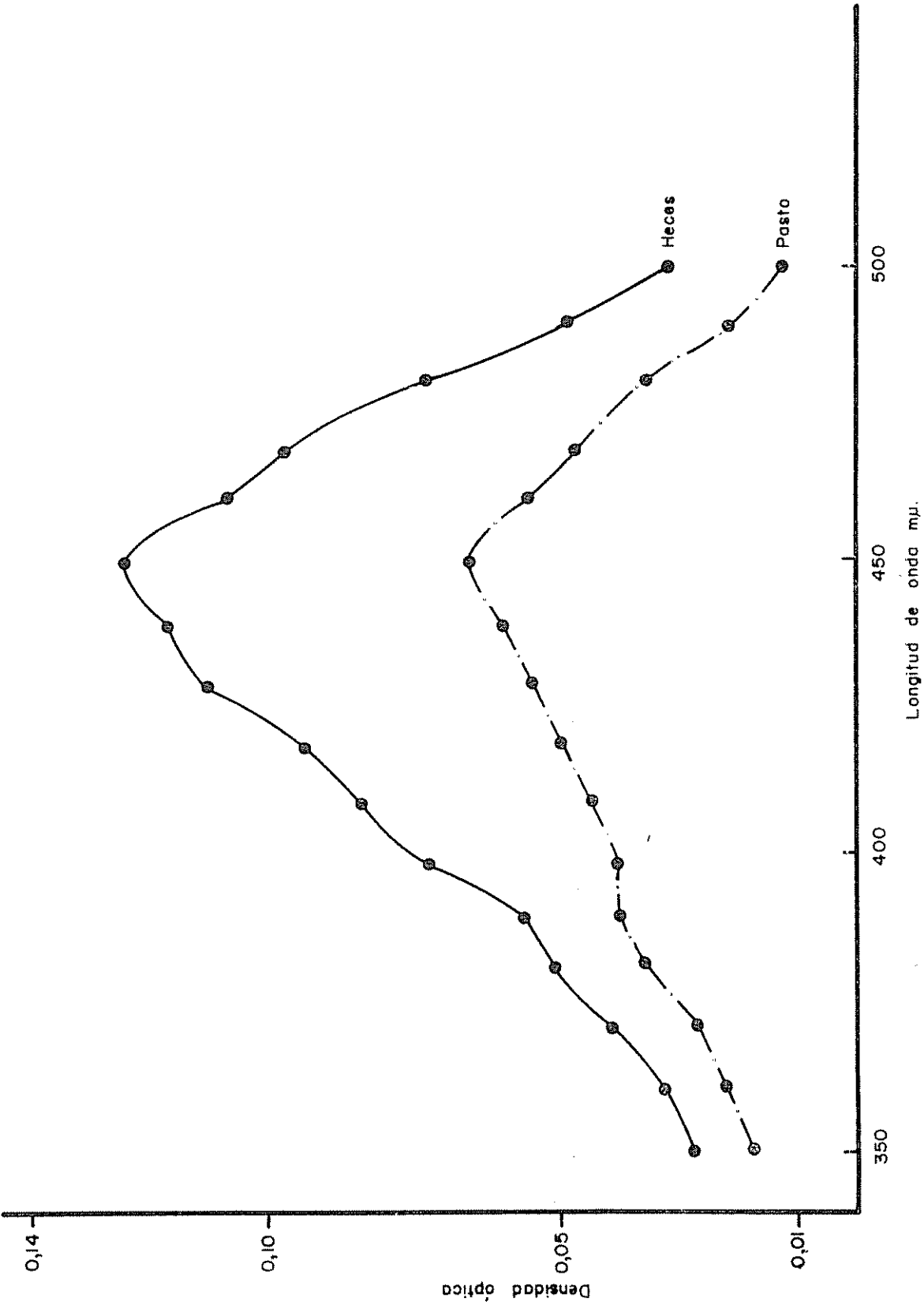


Fig. 1— Curvo de absorción de la luteína.

(22, 23) reportaron la presencia de caroteno, clorofila a, clorofila b, luteína, epóxido de luteína, violoxantina y neoxantina al desarrollar placas con material fresco.

Cuadro 1. Valores de R_f de luteína*

| Pasto | Heces |
|--------------------|--------------------|
| 0, 584 \pm 0, 08 | 0, 587 \pm 0, 07 |

* Promedio de 20 observaciones

En el Cuadro 1 se observa los valores promedio de R_f de luteína provenientes de pasto y heces. Al realizar una prueba de "t" para promedios, no se encontró diferencias significativas. Estos valores se asemejan a los encontrados por Davies (13) y Randerath (51) quienes reportaron valores de 0, 56 utilizando capa fina de tierra sílice impregnada con parafina. Al comparar mediante "t" este valor de la literatura con los encontrados en las muestras de pasto y heces, tampoco se encontró diferencias significativas.

4.1.3. Curva de absorción

En la Figura 1 se observa que el punto de máxima absorbancia para la luteína eluida en etanol al 95%, corresponde a una densidad óptica entre 440 y 450 $m\mu$. Goodwin (19) y Zschele et al. (69) reportan valores de 446, 5 $m\mu$ en etanol, por lo que en el presente trabajo se aceptó este valor de acuerdo al método seguido (22, 23).

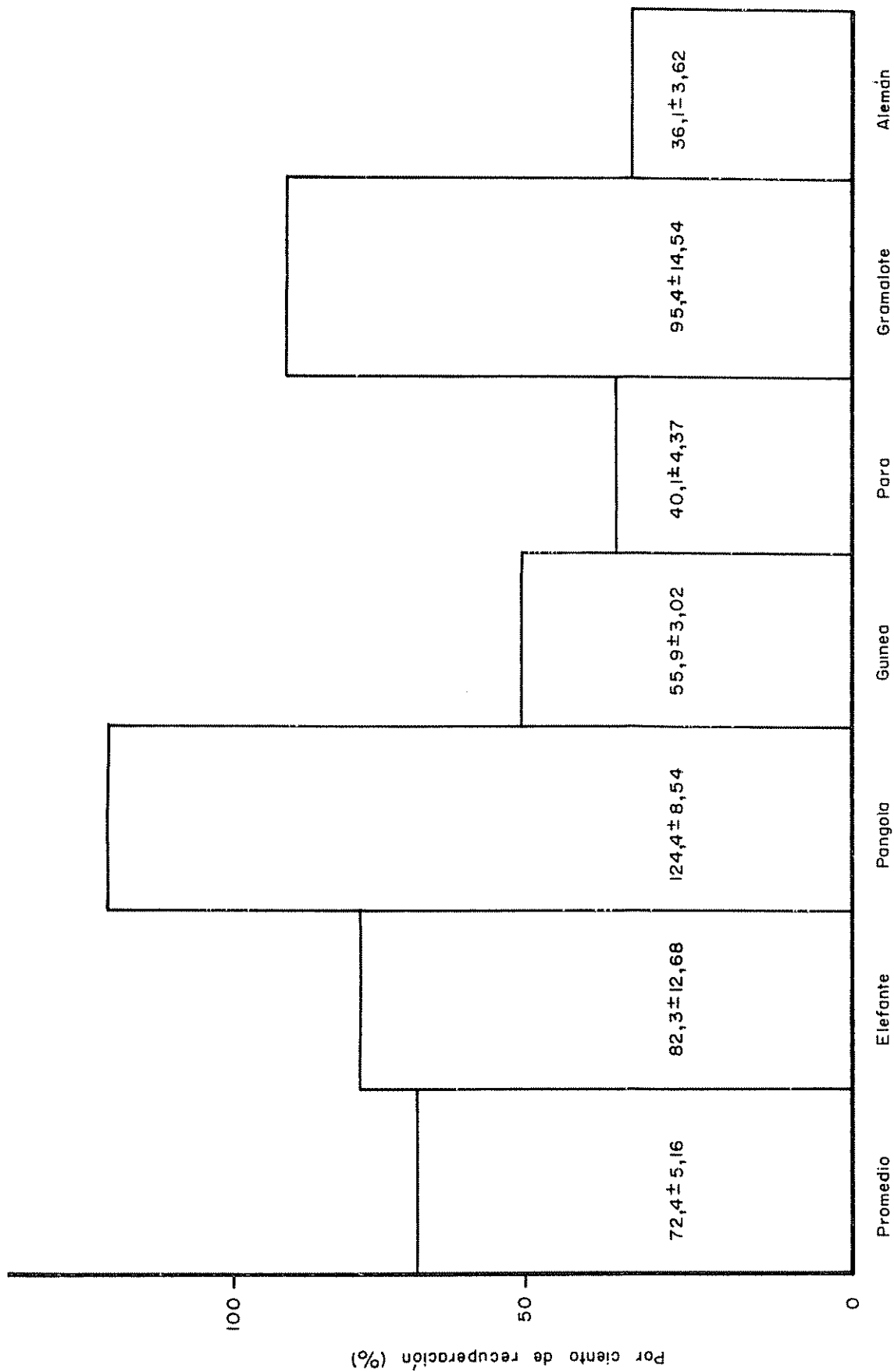


Fig. 2 — Promedio y error standar de recuperación de la luteína, por pastos.

4.1.4. Recuperación de la luteína

En la Figura 2 se observa los valores promedios de la recuperación (indigestibilidad) de la luteína para cada pasto utilizado, siendo un $72,4\% \pm 5,16$ de recuperación promedio. Este valor es inferior a lo encontrado por Davidson (12), con valores de 80 y 90% de recuperación para xantofila. Según se puede apreciar existe diferencia de recuperación entre los pastos, obteniéndose valores desde $36,1\%$ hasta $124,4\%$. Valores de recuperación diferentes al 100% podrían deberse a la asimilación de la luteína a través del tracto digestivo, siendo esta asimilación muy variable dentro de cada forraje. Podría deberse también a una posible alteración de la molécula de luteína a otro compuesto o que se encuentre unido a otro pigmento del grupo xantofila. Por ejemplo Sapozhinkov, citado por Livingston (41), encuentra que la violoxantina es convertida a xantofila en presencia de luz y que la reacción contraria ocurre en la oscuridad. Sin embargo, lo anterior no descarta la posibilidad de que otros pigmentos se conviertan a luteína en el tracto digestivo, resultando recuperaciones mayores del 100% .

Livingston et al. (41) y Nelson (47) reportan valores de luteína con la inclusión de 2% a 4% de zeoxantina y neoxantina.

En la Figura 3 se muestra el efecto de la edad del pasto sobre la recuperación de la luteína. Este efecto no fue significativo, siendo los valores promedios de $69,0\% \pm 11,06$; $77,3\% \pm 5,93$ y $70,8\% \pm 9,18$ para edades de 4, 8 y 12 semanas de edad respectivamente. Esto concuerda con los valores reportados por Livingston et al. (41) con 11 clones de lucerna, quien durante tres meses consecutivos de corte no encontró diferencias significativas en el contenido de luteína; al cuarto mes si detectó diferencias.

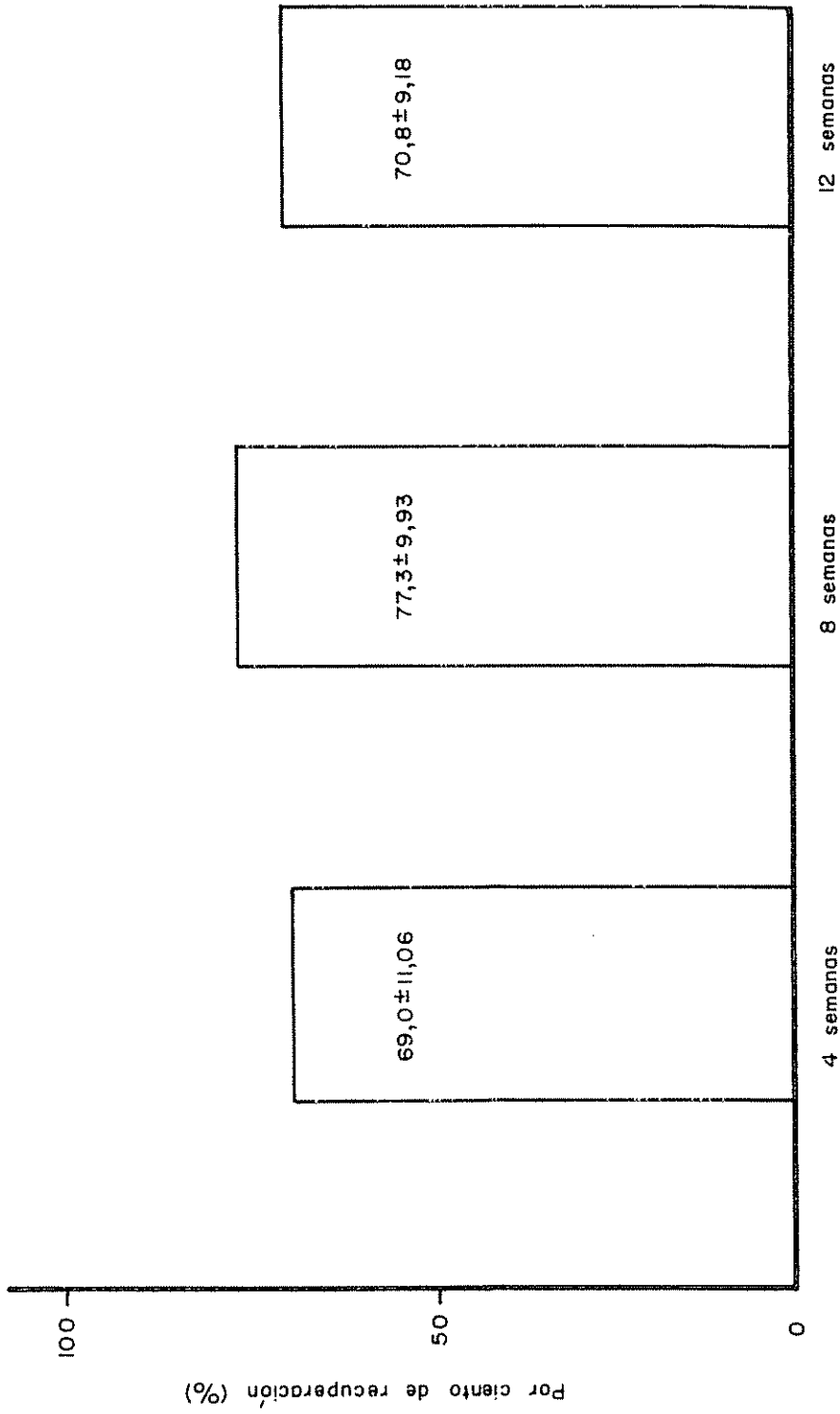


Fig. 3— Promedio y error standar de recuperación de la luteína, por edades.

4.2. Evaluación de la luteína como indicador

4.2.1. Precisión del método

El promedio de MSC medida en forma directa y el promedio de MSC estimada en forma indirecta, se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Consumo de materia seca estimada usando luteína como indicador

| | MSC medida | Estimado con luteína | | r ² |
|-----------------|---------------|----------------------|-------------|----------------|
| | | Sin corregir | Corregido* | |
| Promedio Kg/día | 4,33 ± 1,39 | 2,97 ± 1,70 | 4,25 ± 1,00 | 0,28 |

* Corregido por la ecuación [3].

Como se observa en el Cuadro 2 el promedio de MSC medida fue de 4,33 Kg/día y el promedio de MSC estimada por la relación [1] fue de 2,97 Kg/día. Realizada una comparación de estos promedios mediante la prueba de "t" para observaciones pareadas, se encontró diferencias significativas ($P \leq 0,01$).

El análisis de regresión de Animales/Edades/Pastos, mostrando en el Cuadro 1 del apéndice, generó la ecuación siguiente para la materia seca predecida:

$$Y = 2,650 + 0,563 X \quad [3]$$

en que:

Y = MSC predecida

X = MSC estimada según la relación [1].

Cuadro 3. Análisis de variancia MSC estimada

| Fuentes de variación | G.L. | C.M. | r ² | C.V. |
|------------------------|------|----------|----------------|------|
| Pastos | 5 | 8,894 * | | |
| Regresión | 1 | 6,246 | 0,14 | |
| Desviación | 4 | 9,556** | | |
| Edad/Pastos | 12 | 2,454 | | |
| Regresión | 1 | 1,680 | 0,05 | |
| Desviación | 11 | 2,525 | | |
| Animales/Edades/Pastos | 54 | 1,575 | | |
| Regresión | 1 | 24,010** | 0,28 | |
| Desviación | 53 | 1,151 | | 36,1 |
| Total | 71 | | | |
| Regresión | 1 | 11,285 | 0,071 | |
| Desviación | 70 | 2,110 | | |

* (P ≤ 0,05)

** (P ≤ 0,01)

El Cuadro 1 del apéndice muestra el análisis de variancia y los análisis de regresión realizados en cada estrato. Se observa que únicamente es significativo ($P \leq 0,01$) el efecto de la regresión cuando el análisis se realizó como Animales/Edades/Pastos, con un valor de $r^2 = 0,28$ y que corresponde a la ecuación [3]. Al realizar el análisis de regresión total se encuentra un valor de $r^2 = 0,07$. Los coeficientes de regresión generados se observan en el Cuadro 4. En ambos casos difieren de 0 y 1 que son los valores esperados para b_0 y b_1 de acuerdo con la H_0 . El valor de predictividad, aún para la ecuación [3] es muy bajo. Estos valores de r^2 son más bajos que los obtenidos por Camargo (9), quien usó cromógenos y proteína no asimilable como indicadores, y las mismas muestras del presente trabajo. En dicho trabajo encontró en sus ecuaciones valores de $r^2 = 0,87$ para cromógenos y $r^2 = 0,83$ para proteína no asimilable. Otros investigadores han reportado valores superiores a los del presente estudio con cromógenos, óxido crómico, nitrógeno fecal y magnesio (14, 24, 32, 42, 67, 68).

Cuadro 4. Coeficientes de regresión para el cálculo de MSC predecida, usando luteína como indicador.

| | Coeficientes de regresión | | r^2 |
|------------------------|---------------------------|----------|-------|
| | b_0 | b_1 | |
| Animales/Edades/Pastos | 2,650 * | 0,563 ** | 0,28 |
| Total | 3,702 ** | 0,215 ** | 0,07 |

* ($P \leq 0,05$)

** ($P \leq 0,01$)

La baja predictividad encontrada al usar luteína como indicador de consumo es debida a su recuperación en las heces tan variable, según se observa en el Cuadro 3 y Figuras 2 y 3. Esta variabilidad produjo valores de desviación standar de $\pm 1,70$ Kg/día para promedios de 2,97 Kg/día en los valores de materia seca estimada por la relación[1]. Según el análisis del Cuadro 3, se observa que el efecto de pastos sobre el método fue significativo ($P \leq 0,01$ variabilidad debida a desviación del modelo). En contraste el efecto de la edad no fue significativa. La variabilidad del método debida a los animales fue particularmente grande, llegando a un C. V. de 36,1.

Para estudiar la posibilidad de predecir el consumo dentro de cada especie vegetal, se realizaron también ecuaciones de regresión dentro de pastos. Los valores encontrados para las constantes son mostrados en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Comparación entre MSC medida, MSC estimada y MSC predecida por el método de relación usando luteína como indicador. Valores para cada pasto.

| Pastos | Promedio consumido Kg/día | | | r ² |
|-----------|---------------------------|-----------------------|------------|----------------|
| | MSC medida | Estimado por relación | | |
| | | sin corregir | corregido* | |
| Elefante | 5,35 | 4,35 | 5,35 | 0,08 |
| Pangola | 3,61 | 4,32 | 3,61 | 0,32 |
| Guinea | 4,80 | 2,67 | 4,79 | 0,64 |
| Para | 3,73 | 1,47 | 3,72 | 0,01 |
| Gramalote | 3,75 | 3,34 | 3,74 | 0,08 |
| Alemán | 4,76 | 1,71 | 4,93 | 0,34 |

* Corregido por ecuaciones del Cuadro 3 del apéndice.

Al realizar las pruebas de "t" para observaciones pareadas, se encontró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para los promedios medidos vs estimados de los pastos pangola, guinea, para y alemán. De estos resultados se observa que cuanto mayor es la recuperación de la luteína la MSC estimada se aproxima más a la MSC medida. Este es el caso del elefante, pangola y pasto gramalote. La predictividad de las ecuaciones de regresión fue muy bajo, con valores de r^2 entre 0,01 y 0,64. El estudio realizado clasificando el consumo de acuerdo con la edad del pasto arroja resultados semejantes, tal como se observa en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación entre MSC medida, MSC estimada y MSC predecida por el método de relación usando luteína como indicador

| Edad | Promedio consumido Kg/día | | | r^2 |
|------------|---------------------------|-----------------------|------------|-------|
| | MSC medida | Estimado por relación | | |
| | | sin corregir | corregido* | |
| 4 semanas | 4,30 | 1,42 | 4,29 | 0,01 |
| 8 semanas | 4,14 | 1,41 | 4,14 | 0,09 |
| 12 semanas | 4,56 | 1,37 | 4,56 | 0,15 |

* Corregida por las ecuaciones del Cuadro 5 del apéndice.

En el Cuadro 6 se muestra los valores de MSC medida, MSC estimada por la relación [1] y MSC predecida por las ecuaciones de regresión, dadas en el apéndice, para cada edad. Los valores de MSC medida vs MSC estimada difieren significativamente ($P \leq 0,01$). Al ser corregidas por su

ecuación de regresión no se encontró diferencias significativas, pero al observar el Cuadro 4 del apéndice se encuentra que los valores de r^2 fueron extremadamente bajos 0,01, 0,09 y 0,15 para 4, 8, y 12 semanas de edad respectivamente.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

1. No es posible estimar con suficiente precisión el consumo de materia seca usando luteína como indicador.
2. Se recomienda continuar los estudios con otros indicadores que ofrecen mejores posibilidades.

6. RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la C. E. A., en Turrialba, Costa Rica. El objetivo fue evaluar la Luteína (3', 3' dihidroxi α caroteno) como indicador para determinar el consumo de forrajes. Se utilizó muestras compuestas provenientes de 18 pruebas de consumo correspondientes a seis gramíneas tropicales: Efeante (Pennisetum purpureum); Pangola (Digitaria decumbens); Para (Brachiaria mutica); Aleman (Echynocloa polystachia); Guinea (Panicum maximun) y Gramalote (Paspalum fasciculatum) de 4, 8 y 12 semanas de edad. Se utilizaron 72 animales con pesos entre 150 y 450 Kg. de peso. La luteína fue colectada por cromatografía en capa fina previa extracción de los pigmentos totales por destilación en soxlet durante 4 horas. Luego fue eluida en etanol, efectuándose las lecturas en un espectrofotómetro a 446, 5 m μ . Se utilizó la relación Materia Seca Consumida = (Concentración de Luteína Fecal/Concentración de Luteína Consumida) x Materia Seca Fecal, [MSC = CLF/CLC x MSF], calculando las concentraciones de luteína según la densidad óptica leída.

El valor promedio de recuperación de la luteína fue de 72, 40% \pm 5, 16, siendo para el Elefante 82, 3% \pm 12, 68, Pangola 124, 4% \pm 8, 54, Guinea 55, 9% \pm 3, 02, Para 40, 1% \pm 4, 37, Gramalote 95, 4% \pm 14, 54 y Aleman 36, 1% \pm 3, 62. De acuerdo con la edad, fue para 4 semanas, 69, 0% \pm 11, 06; para 8 semanas, 77, 3% \pm 9, 93; y para 12 semanas, 70, 8% \pm 9, 18. El promedio de MSC estimada fue de 2, 97 Kg/día, difiriendo significativamente del valor medido de 4, 33 Kg/día ($P \leq 0.01$). Los valores estimados fueron corregidos por la ecuación generada del análisis de regresión animales/edades/

pastos $Y = 2,650 + 0,563 X$ en que $Y = \text{MSC}$ predecida, $X = \text{MSC}$ estimada por la relación $\text{MSC} = \text{CLF}/\text{CLC} \times \text{MSF}$. Esta ecuación presentó un $r^2 = 0,28$ considerado muy bajo.

Regresiones realizadas dentro de cada pasto no fueron significativas a excepción del pasto guinea y aleman con un $r^2 = 0,64$ y $0,34$ respectivamente. Las regresiones dentro de cada edad no fueron significativas. Estos valores tan bajos de predictividad fueron debidos a la gran variabilidad encontrada en la recuperación fecal de la luteína.

Se concluyó que la utilización de la luteína como indicador para estimar indirectamente el consumo de forrajes es imprecisa, recomendándose el estudio de otros indicadores que ofrezcan mejores posibilidades.

6a. SUMMARY

EVALUATION OF LUTEIN AS A TRACER FOR FORAGE
CONSUMPTION ESTIMATION

The present study was carried out at the Inter-American Institute of Agricultural Sciences of the OAS, in Turrialba, Costa Rica. The objective was to evaluate lutein as a tracer for estimating forage consumption. Composite samples derived from 18 consumption trials of six tropical grasses were utilized. These grasses were Elephant (Pennisetum purpureum), Pangola (Digitaria decumbens), Para (Brachiaria mutica), German (Echinochloa polystachya), Guinea (Panicum maximum) and Gramalote (Paspalum fasciculatum), and represented cuttings at 4, 8 and 12 weeks of age. Seventy two animals ranging in weight from 150 to 450 Kg were used. The lutein was collected for thin-layer chromatography analysis following extraction of all pigments by soxlet distillation for four hours. The samples were then clarified in ethanol and readings were made from a spectrophotometer at wavelength 446, 5 m μ . The relation: Dry Matter Consumed = (Fecal Lutein Concentration/Lutein Concentration Consumed) x Fecal Dry Matter [DMC = FLC/LCC x FDM], was used with lutein concentrations calculated according to optical density readings.

The average values of lutein recovered was $72.40 \pm 5.16\%$, with averages for the various grasses of $82.3 \pm 12.68\%$ for Elephant, $124.4 \pm 8.54\%$ for Pangola, $55.9 \pm 3.02\%$ for Guinea, $40.1 \pm 4.37\%$ for Para, $95.4 \pm 14.54\%$ for Gramalote, and $36.1 \pm 3.62\%$ for German. Averages according to ages were: $69.0 \pm 11.06\%$ for 4 weeks, $77.3 \pm 9.93\%$ for 8 weeks, and $70.8 \pm 9.18\%$ for 12 weeks. The average dry matter consumption was estimated to be 2.97 Kg/day which differed significantly from the average measured value of

4.33 Kg/day ($P \leq 0.01$). The estimated values were corrected by an equation resulting from the analysis of regression derived on the basis of animal/cutting age/grasses: $Y = 2.65 \pm 0.563 X$. Where Y = predicted dry matter consumption, X = dry matter consumption estimated from the equation $DMC = FLC/LCC \times FDM$. This prediction equation resulted in an $r^2 = 0.28$ which was considered very low. Regressions obtained within each grass species were not significant with the exception of Guinea and German with $r^2 = 0.64$ and 0.34 , respectively. Regressions within cutting ages were not significant. These very low values of predictability resulted from the large variability found in the recovery of fecal lutein. It was concluded that the estimation of forage consumption using lutein as the tracer was unreliable. Consequently it may be recommended that future studies be directed toward other tracers.

LITERATURA CITADA

1. ALMENDRIGER, R. y HINDS, F. C. Apparent carotenoid increases in the digestive tract of beef cattle. *Journal of Nutrition* 97(1): 13-18. 1969.
2. ARNOLD, G. W. Empleo de técnicas in vitro en asociación con técnicas de muestreo para medir la digestibilidad y el consumo de forrajes bajo pastoreo. In Paladines, C. ed., Métodos in vitro para determinar el valor nutritivo de los forrajes. Montevideo, IICA, Zona Sur, 1967. pp. 61-100.
3. _____ y DUDZINSKI, M. L. The use of faecal nitrogen as an index for estimating consumption of herbage by grazing animals. *Journal of Agricultural Science* 61(1):33-43. 1963.
4. BICKOFF, E. M., et al. Alfalfa carotenoids. Xanthophylls in fresh and dehydrated alfalfa. *Journal of Agricultural of Food and Chemistry* 2(11):563-567. 1954.
5. BLASS, U., ANDERSON, J. M. y CALVIN, M. Biosynthesis and possible functional relationships among the carotenoids; and between chlorophyll A and chlorophyll B. *Plant Physiology* 34(3):329-333. 1959.
6. BONNER, J. y VARNER, J. E. The isoprenoids. In _____ Plant biochemistry. New York, Academic Press, 1965. pp. 665-691.
7. BRISSON, G. J., ANGUS, W. J. y SYLVESTRE, F. E. Plant pigments as internal indicators of digestibility of dry matter of pasture herbage. *Canadian Journal of Agricultural Science* 34(5):528-532. 1954.
8. _____ y HATINA, G. C. A method for the extraction of pigments (Chromogens) from feces of cattle and sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 37(2):136-142. 1947.
9. CAMARGO, G. A. Evaluación del óxido crómico, cromógenos vegetales y proteína no asimilable como indicadores para estimar el consumo de forrajes. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1969. 65 p.
10. CHOLNOKY, L. et al. Function of carotenoids in chlorophyll containing organs. *Nature* 178(4530):410-411. 1956.
11. COOK, C. W. y HARRIS, L. E. A comparison of the lignin ratio technique and chromogen method of determining digestibility and forage consumption of inert range plants by sheep. *Journal of Animal Science* 10(3):565-573. 1951.

12. DAVIDSON, J. The chromogen method for determining the digestibility of dried grass by sheep. *Journal of Science of Food and Agriculture* 5(5):209-212. 1954.
13. DAVIES, B. H. Analysis of carotenoid pigments. In Goodwin, T. W., ed. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. New York, Academic Press, 1965. pp. 489-532.
14. DAVIS, L. E., JORDAN, R. M. y MARTEN, G. C. Evaluation of forage digestibility prediction equations using chromogen and nitrogen as fecal index indicators. *Agronomy Journal* 60(4):420-422. 1968.
15. DAVIS, R. E., MILLER, C. O. y LINDHALL, I. L. Apparent digestibility by sheep of lignin in pea and lima-bean vines. *Journal of Agricultural Research* 47(10):285-288. 1947.
16. DUA, P. N. et al. Utilization of Xanthophylls from natural sources by the chick. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 15(2):324-328. 1967.
17. GONZALEZ, E. Ecuaciones de predicción del valor nutritivo de los forrajes. *Agronomía Tropical (Serie Zootécnica) (Venezuela)* 20(6):405-412. 1970.
18. GOODWIN, T. W. The bioynthesis of carotenoids. In _____, ed. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. New York, Academic Press, 1965. pp. 143-169.
19. _____. Distribution of carotenoids. In _____, ed. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. New York, Academic Press, 1965. pp. 127-140.
20. GREENHALGH, J. F. D. y CORBETT, J. L. The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage, I. Nitrogen and chromogen as faecal index substances. *Journal of Agricultural Science* 55(3):371-376. 1960.
21. _____ y CORBETT, J. L. The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage, II Regressions of digestibility on faecal nitrogen concentration, this determination in continuous digestibility trials and the effect of various factors on their accuracy. *Journal of Agricultural Science* 55(3):377-386. 1960.
22. HAGER, A. y MEYER-BERTENRATH, T. Verteilungschromatographische trennung von chlorophyllen und carotinoiden grüner pflanzen an dünnschichten. *Planta*. 58(5):564-568. 1962.
23. _____ y MEYER-BERTENRATH, T. Die isolierung und quantitative bestimmung der carotinoide und chlorophylle von blättern, algen und islierten chloroplasten mit hilfe dünnschichtchromatographischer methoden. *Planta* 69(3):198-217. 1966.

24. ITURBIDE, A. Evaluación del sistema cromógeno óxido crómico para estimar consumo y digestibilidad de forrajes en pastoreo directo. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1965. 135 p. (mimeografiado).
25. _____. El óxido crómico como indicador externo para estimar producción fecal y consumo en las pruebas de digestibilidad Turrialba 17(3):304-313. 1967.
26. _____ y BATEMAN, J. V. Método para la determinación de feofitina en extractos cromogénicos de heces y pastos. Turrialba 17(1): 91-93. 1967.
27. _____ y BATEMAN, J. V. Evaluación de factores que influyen en la precisión de la técnica de los pigmentos vegetales o cromógenos para estimar digestibilidad de forrajes. Turrialba 18(2):101-109. 1968.
28. JONES, L. H. P. y HANDRECK, K. A. The relation between the silica content of the diet and the excretion of silica by sheep. Journal of Agricultural Science 65(1):129-134. 1965.
29. KANE, E. A. The effect of light on optical density of extracts of fecal pigments in digestibility studies. Journal of Dairy Science 38(5): 625. 1955.
30. _____ y JACOBSON, W. C. An improved method of using plant pigments as an indicator of digestibility. Journal of Dairy Science 37(6):672-674. 1954.
31. KENNEDY, W. K., CARTER, A. H. y LANCASTER, R. J. Comparison of faecal pigments and faecal nitrogen as digestibility indicators in grazing cattle studies. New Zealand Journal of Agricultural Research 2(3):627-638. 1959.
32. LAMBOURNE, L. J. y READON, T. F. The use of chromium oxide and faecal nitrogen concentration to estimate the pasture intake of Merino wethers. Australian Journal of Agricultural Research 14(2):257-271. 1963.
33. LANCASTER, R. J. y BARTRUM, M. P. Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. IV. A source of error in the chromogen technique of estimating the digestibility of fodders. New Zealand Journal of Science and Technology 35(6):489. 496. 1954.
34. LANGE, N. A., ed. Handbook of chemistry. Ohio, Handbook Publishers, 1952. pp. 700-701.

35. LANGLANDS, J. P. Studies on the nutritive value fo the diet selected by grazing sheep. II. Some sources of error when sampling oesophageally fistulated sheep at pasture. *Animal Production* 9(1):167-175. 1967.
36. _____ y CORBETT, J. L. A study of the dissolved faeces fraction method for the indirect estimation of herbage intake. *Journal of Agricultural Science* 63(2):305-310. 1964.
37. _____. et al. The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage. III Regresions of digestibility on faecal nitrogen concentration: effects of species and individuality of animal and of the method of determining digestibility upon the relationships. *Journal of Agricultural Science* 61(2):221-226. 1962.
38. _____. et al. Estimation of the faeces output of grazing animals from the concentration of chromium sesquioxide in a sample of faeces. I Comparison of estimates from sample taken at fixed times of day with faeces outputs measured directly. *British Journal of Nutrition* 17(2):211-218. 1963.
39. _____. et al. Estimation of the faeces output of grazing animals from the concentration of chromium sesquioxide in a sample of faeces. II Comparison of estimate from samples taken at fixed samples collected from the sward. *British Journal of Nutrition* 17(2):219-226. 1963.
40. LINEHAN, P. A. Use of cage and move-strip methods for mesuring the forage consumed by grazing animals. In *International Grassland Congress, 6th, Pennsylvania, 1952. Proceedings. s. n. t. v. 2, pp. 1328-1333.*
41. LIVINGSTON, A. L. et al. Variation in the xanthophyll and carotene content of lucerne clovers and grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 19(9):632-636. 1968.
42. McMANUS, W. R. et al. Prediction of herbage intake from nitrogen, copper, magnesium and silicon concentration in faeces. *Journal Agricultural Science* 69(2):263-270. 1967.
43. MAYNARD, L. A. *Nutrición animal. Traducido de la 3a. ed. por E. Escalona. México, D. F., UTEHA, 1955. 530 p.*
44. MILLER, E. W. Pigmentos de las plantas. In _____. *Fisiología vegetal. Traducido por F. de La Torre. México, D. F., UTEHA, 1967. pp. 45-62.*
45. MINSON, D. J. y KEMP, C. D. Studies in the digestibility of herbage. IX. Herbage and faecal nitrogen as indicator of herbage organic matter digestibility. *Journal of the British Grassland Society* 16(1):76-79. 1961.

46. MOORE, J. H. y WINTER, O. B. Rate of passage of inert materials throughout the digestive tract of the bovine. *Journal of Dairy Science* 17(4):297-305. 1934.
47. NELSON, J. W. y LIVINGSTON, A. L. Stabilization of xanthopyll and carotene by ethoxyquin during thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography* 28(2):465-467. 1967.
48. OWEN, J. B. A new method of estimating the dry-matter intake of grazing sheep from their faecal output. *Nature* 192(4797):92. 1961.
49. PEREZ, A. S. Evaluación de métodos para estimar producción fecal en bovinos, usando óxido crómico. Tesis Mg. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1971. 67 p. (mimeografiado).
50. PFANDER, W. H. Forage intake and digestibility - Now and when. In *National Conference of Forage Quality Evaluation and Utilization*, Nebraska, 1969. Proceedings. Lincoln, Nebraska Center, 1970. pp. H1-21.
51. RANDERATH, K. Thin-Layer chromatography. Traducido del alemán por D. D. Libman. New York, Academic Press, 1963. 250 p.
52. RAYMOND, W. F. y MINSON, D. J. The use of chromic oxide for estimating the faecal production of grazing animals. *Journal of the British Grassland Society* 10(4):282-296. 1955,
53. _____ et al. Studies in the digestibility of herbage III y IV. The use of faecal collection and chemical analysis in pasture studies a) Ratio and tracer methods. b) Faecal index methods. *Journal of the British Grassland Society* 9(1):69-82. 1954.
54. REID, J. T. El valor relativo de los resultados agronómicos y con animales en investigaciones sobre pasturas. In Paladines, O., ed. *Empleo de animales en las investigaciones sobre pasturas*. Montevideo, IICA, Zona Sur, 1967. pp. 31-72.
55. _____ et al. A procedure for measuring the digestibility of pasture forage under grazing conditions. *Journal of Nutrition* 46(2): 255-269. 1952.
56. _____ et al. A new indicator method for the determination of digestibility and consumption of forage by ruminants. *Journal of Dairy Science* 33(1):60-71. 1950.
57. RICHARDS, C. R. y REID, J. T. The use of methoxyl group in forage and fecal materials as an index of the feeding value of forage. *Journal of Dairy Science* 35(7):595-601. 1952.

58. RICHARDS, C.R. y WEAVER, H.G. y DONNOLLY, J.D. Comparison of methoxyl, lignin, crude fiber and crude protein contents of forage and feces as indirect indicators of dry matter digestibility. *Journal of Dairy Science* 41(7):956-961. 1958.
59. SHEARER, D.A. Benzene-ethanol extracts of forage and feces as indicators of digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 11(1):33-35. 1963.
60. SMART, W.G. et al. Pigment involved in the chromogen(s) ratio method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1(4):318-321. 1953.
61. STREETER, C.L. A review of techniques used to estimate the in vivo digestibility of grazed forage. *Journal of Animal Science* 28(5):757-768. 1969.
62. TROELSEN, J.E. Preliminary observation in the use of a sustained release pellet for administration of chromic oxide to sheep in digestibility studies. *Canadian Journal of Animal Science* 4(1):71-77. 1961.
63. _____. Plant chromogens as an indicator in estimating the digestibility of forage crops by sheep. *Canadian Journal of Plant Science* 41(4):732-739. 1961.
64. TURRIZA, E.L. Consumo por el ganado, digestibilidad y composición química de seis gramíneas tropicales. Tesis Mg.Sc., Turrialba, Costa Rica, IICA, 1970. 35 p. (mimeografiado).
65. VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. *Journal of Animal Science* 26(1):119-128. 1967.
66. WALLACE, J.D. y VAN DYNE, G.M. Precision of indirect method for estimating digestibility of forage consumed by grazing cattle. *Journal of Range Management* 23(6):424-430. 1970.
67. WILKINSON, J.M. y PRESCOTT, J.H.D. The use of chromic oxide in the measurement of individual feed intake in cattle fed on silage and barley. *Animal Production* 12(1):71-80. 1970.
68. WITTKE, E.G. Uso del nitrógeno y cromógenos como índices fecales en combinación con el óxido crómico, para determinar el valor nutritivo de praderas en condiciones de pastoreo. Tesis Mg.Sc. Colonia, Uruguay, IICA, 1965. 128 p. (mimeografiado).
69. ZSCHEILE, F.P. et al. The preparation and absorption spectra of fine pure carotenoid pigments. *Plant Physiology* 17(3):331-345. 1942.

A P E N D I C E

UTILIZACION DE LA DENSIDAD OPTICA COMO UNIDADES DE LUTEINA

Por espectrofotometría la concentración de luteína en las muestras de pastos y heces, por la siguiente fórmula (22, 23):

$$C = \frac{A \cdot b \cdot c \cdot 10}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot d \cdot e} \quad [1]$$

donde:

C = concentración de luteína (mg/gm)

A = densidad óptica de la muestra de luteína

b = ml de extracto crudo de pigmentos en acetona (25 ml.)

c = ml de solvente utilizado en la elución de la banda de luteína (5ml)

d = ml de extracto crudo de pigmentos aplicado sobre la placa (1m)

e = gramos del material con que se inició la extracción de pigmentos (5 gr).

10 = factor constante (mg/ml)

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorción, dado en tablas en función del soluto, disolvente y longitud de onda.

Al tener todos los valores b, c, d, e, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ y 10 constantes se obtiene un solo valor X:

$$C = A \cdot X \quad [2]$$

según relación:

$$MSC = \frac{CIF}{CIC} \times MSF \quad [3]$$

Denominado:

CLF = Af

ULO = Ao . MSO

ULR = Ar . MSR

luego CLC será:

$$CLC = \frac{A_o . MSO - A_r . MSR}{MSO - MSR} \quad [4]$$

La concentración de luteína es medida según la ecuación [2]

$$CIF = A_f . X$$

$$CIO = A_o . X$$

$$CIR = A_r . X$$

siendo la CIC:

$$CIC = \frac{(A_o . X) MSO - (A_r . X) MSR}{MSO - MSR} \quad [5]$$

factorizando:

$$CIC = \frac{X (MSO . A_o - MSR . A_r)}{MSO - MSR} \quad [6]$$

por la relación [3]

$$MSC = \frac{X . A_f}{X (MSO . A_o - MSR . A_r) / (MSO - MSR)} \times MSF \quad [7]$$

simplificando:

$$MSC = \frac{A_f}{(MSO . A_o - MSR . A_r) / (MSO - MSR)} \times MSF \quad [8]$$

por definición de términos:

$$MSC = \frac{CLF}{CLC} \times MSF \quad [9]$$

Cuadro 1. Análisis de variancia para MSC medida

| Fuentes de Variación | G.L. | C.M. | r ² | C.V. |
|------------------------|------|----------|----------------|------|
| Pastos | 5 | 6,312* | | |
| Regresión | 1 | 4,430 | 0,140 | |
| Desviación | 4 | 6,782** | | |
| Edades/Pastos | 12 | 0,934 | | |
| Regresión | 1 | 0,639 | 0,057 | |
| Desviación | 11 | 0,961 | | |
| Animales/Edades/Pastos | 54 | 1,773 | | |
| Regresión | 1 | 27,039** | 0,282 | |
| Desviación | 53 | 1,296 | | 25,6 |
| Total | 71 | | | |
| Regresión | 1 | 9,929* | 0,071 | |
| Desviación | 70 | 1,835 | | |

* ($P \leq 0,05$)

** ($P \leq 0,01$)

Cuadro 2. Análisis de variancia para MSC medida de cada pasto, usando luteína como indicador.

| PASTO | F.V. | G.L. | C.M. | F | r ² | C.V. |
|-----------|------------|------|--------|----------|----------------|------|
| Elefante | Regresión | 1 | 1,897 | 0,880 | 0,08 | |
| | Desviación | 10 | 2,256 | | | 28,0 |
| Pangola | Regresión | 1 | 3,657 | 4,864 | 0,32 | |
| | Desviación | 10 | 0,751 | | | 20,1 |
| Guinea | Regresión | 1 | 11,590 | 17,763** | 0,63 | |
| | Desviación | 10 | 0,652 | | | 16,8 |
| Para | Regresión | 1 | 0,107 | 0,081 | 0,01 | |
| | Desviación | 10 | 1,318 | | | 41,8 |
| Gramalote | Regresión | 1 | 1,691 | 0,913 | 0,08 | |
| | Desviación | 10 | 1,852 | | | 51,2 |
| Aleman | Regresión | 1 | 6,653 | 5,330* | 0,34 | |
| | Desviación | 10 | 1,248 | | | 30,4 |

* (P ≤ 0,05)

** (P ≤ 0,01)

Cuadro 3. Coeficiente de regresión para el cálculo de MSC predecida para cada pasto usando luteína como indicador.

| PASTO | Coeficientes de regresión | | r^2 |
|-----------|---------------------------|---------|-------|
| | b_0 | b_1 | |
| Elefante | 4,617** | 0,169 | 0,08 |
| Pangola | 0,778 | 0,657 | 0,32 |
| Guinea | 1,611** | 1,195** | 0,63 |
| Para | 3,565* | 0,127 | 0,01 |
| Gramalote | 2,715** | 0,311 | 0,08 |
| Aleman | 2,981** | 1,037* | 0,34 |

* ($P \leq 0,05$)** ($P \leq 0,01$)

Cuadro 4. Análisis de variancia para MSC medida por cada edad, usando luteína como indicador.

| EDAD | F.V. | G.L. | C.M. | F | r^2 | C.V. |
|------------|------------|------|-------|-------|-------|------|
| 4 semanas | | | | | | |
| | Regresión | 1 | 0,133 | 0,063 | 0,002 | |
| | Desviación | 22 | 2,106 | | | 31,3 |
| 8 semanas | | | | | | |
| | Regresión | 1 | 4,419 | 2,332 | 0,095 | |
| | Desviación | 22 | 1,894 | | | 46,8 |
| 12 semanas | | | | | | |
| | Regresión | 1 | 6,570 | 3,899 | 0,150 | |
| | Desviación | 22 | 1,684 | | | 39,9 |

Cuadro 5. Coeficientes de regresión para el cálculo de MSC predecida para edades, usando luteína como indicador.

| EDAD | Coeficientes de regresión | | r^2 |
|------------|---------------------------|-------|-------|
| | b_0 | b_1 | |
| 4 semanas | 4,157* | 0,054 | 0,002 |
| 8 semanas | 3,357** | 0,251 | 0,095 |
| 12 semanas | 3,736** | 0,261 | 0,150 |

* ($P \leq 0,01$)

** ($P \leq 0,05$)