



**CINÉTICA DEL ÁCIDO FERÚLICO Y FERULATO DE ETILO EN BOVINOS
PRODUCTORES DE CARNE**

POR:

M. V. Z. CUAHUTEMOC GONZÁLEZ PLASCENCIA

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias**

Área Mayor: Nutrición Animal

**Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Zootecnia y Ecología
Secretaría de Investigación y Posgrado**

Cinética del ácido ferúlico y ferulato de etilo en bovinos productores de carne. Tesis presentada por Cuahutemoc González Plascencia como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:

M. A. Luis Raúl Escárcega Preciado
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

M. C. Antonio Humberto Chávez Silva
Secretario de Investigación y Posgrado

D. Ph. Pablo Fidel Mancillas Flores
Coordinador Académico

Ph. D. David Domínguez Díaz
Presidente

DICIEMBRE 04 - 2015

Fecha

Comité:

Ph. D. David Domínguez Díaz
D. Ph. Francisco Castillo Rangel
Dr. Juan Ángel Ortega Gutiérrez
Dr. José Carlos Rodríguez Figueroa

ii

© Derechos Reservados

Cuahutemoc González Plascencia
PERIFÉRICO FRANCISCO R.
ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA,
CHIH., MÉXICO C.P. 31453

DICIEMBRE 2015

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por la oportunidad y la salud para poder llevar a cabo este gran logro en mi vida.

Al CONACyT, por la beca económica otorgada para manutención. A la Facultad de Zootecnia y Ecología de la UACH por aceptarme en su programa de Maestría en Producción Animal. A ProInnova y laboratorios MinKab S.A. de C.V. por el financiamiento del proyecto de investigación. Al Ph. D. David Domínguez Díaz por su apoyo, paciencia y dedicación en el desarrollo de la tesis. Al D. Ph. Francisco Castillo Rangel por su participación en el trabajo de campo, análisis de laboratorio y escritura de tesis. Al Dr. Juan Ángel Ortega Gutiérrez, por su apoyo en el análisis estadístico de los datos. Al Dr. José Carlos Rodríguez Figueroa, por su apoyo en el conocimiento de la técnica de análisis. A mis amigos: Daniel Díaz, Jaime Molina, Normando Hernández, Daniel Contreras, David Verdugo, Erik Arguelles y Luis Bremer por su apoyo en el trabajo de campo. A Sofía Soto por su apoyo en los análisis de laboratorio. A mis padres: Mayolo González, Alicia Plascencia y hermanos Cristal González, Cuitláhuac González y Moctezuma González por sus consejos, motivación y apoyo económico cuando lo necesité, y en general a mis familiares. A la Familia Díaz Irigoyen por su gran amistad, consejos y apoyo brindados durante mi estancia. A mis amigos de la Universidad Autónoma de Zacatecas y mi pueblo que me ofrecieron su apoyo moral y consejos: Irving Díaz, Misael Mercado, Edgar Verdeja y Pascual Verdeja.

DEDICATORIA

A mi padre Mayolo González Tello por su apoyo incondicional y sus grandes consejos y uno que otro regaño necesario que fue tomado como crítica constructiva y sé que mis logros son al igual de él como padre.

A mi madre Alicia Plascencia Robles por su gran amor que fue brindado incondicionalmente y sus consejos como madre que nos fue de gran ayuda a mí y mis hermanos.

A mis hermanos Cuitláhuac González Plascencia y Moctezuma González Plascencia que siempre me brindaron su amistad y el gran cariño que les tengo a toda mi familia y lo que representan para mí.

A la familia de mi hermana Cristal González Plascencia y su esposo Gabriel Mojica gracias por su apoyo y motivación, a mi sobrinita Renata Mojica González a la cual quiero muchísimo.

“PARA TODO HAY TIEMPO EN LA VIDA, Y NUNCA DEJES DE PERSEGUIR
TUS SUEÑOS”

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 24 de septiembre de 1990 en Juchipila, Zacatecas, México.

- | | |
|-----------|--|
| 2007-2012 | Estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma de Zacatecas obteniendo el título de Médico Veterinario Zootecnista. |
| 2011-2012 | Estadía Profesional en la Universidad Autónoma de Chihuahua, en el área de reproducción bajo la supervisión del M. C. Alfredo Anchondo Garay; y prácticas en el establo "Granjas Ninfa". |
| 2012-2013 | Encargado del Rancho de Engorda de Bovinos "El Chote", en la empresa Praderas Huastecas; Tamuin, S. L. P. |
| 2013-2015 | Estudiante de Maestría en Producción animal, Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua, México. |

RESUMEN

CINÉTICA DEL ÁCIDO FERÚLICO Y FERULATO DE ETILO EN BOVINOS PRODUCTORES DE CARNE

POR:

M. V. Z. CUAHUTEMOC GONZÁLEZ PLASCENCIA

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. David Domínguez Díaz

El ácido ferúlico es un compuesto fenólico de bajo peso molecular y elevada capacidad de absorción. El estudio evaluó la cinética del ácido ferúlico y ferulato de etilo en bovinos de carne, utilizando 6 vaquillas cruzadas (Hereford × Angus) fistuladas en rumen con edad promedio de 12 meses y peso inicial de 340 ± 10 kg, que fueron alojadas en corraletas individuales y alimentadas *ad libitum* con una dieta de finalización. Los tratamientos fueron: control (CON; dieta basal), ácido ferúlico (AF; dieta basal + 85.1 g/animal) y ferulato de etilo (FE; dieta basal + 85.1 g/animal). La concentración de AF y FE fueron determinadas en líquido ruminal, sangre y orina en las primeras 24 h post dosificación, mediante HPLC. Se utilizó un cuadro latino 3×3 repetido en reglón. Los picos de AF (2808.3, 99.6, 2130.8 ppm) y FE (515, 102.5, 527.5 ppm) fueron encontrados a las 1 h, 15 min y 4 h post dosificación, para líquido ruminal, sangre y orina, respectivamente. Mientras que el retorno a sus concentraciones basales fue a las 12 h post infusión, para líquido ruminal y

plasma, y 24 h para orina. La tasa de desaparición para AF y FE en líquido ruminal, sangre y orina fue: -0.4759, -0.276 y -0.1819 ppm, -0.276 y -0.250 - 0.0557 ppm, mientras que para AF y FE en CON fue: 0, -0.422, -0.0800 ppm y 0, -0.422, -0.0800 ppm, respectivamente. Esto muestra la eficientemente absorción ruminal de AF y FE, y su rápida excreción en orina.

ABSTRACT

FATE OF FREE FERULIC ACID AND ETIL FERULATE IN BEEF CATTLE

BY

CUAHUTEMOC GONZÁLEZ PLASCENCIA

The ferulic acid is a phenolic compound of low molecular weight and highly absorbable. The objective was to evaluate the fate of a single dosage of free ferulic acid and ethyl ferulate in beef cattle. Six crossbred (Hereford × Angus) heifers with a rumen fistula, averaging 12 months age and an initial body weight of 340 ± 10 kg were used. Animals were housed in individual pens and fed *ad libitum* with a feedlot diet. Treatments consisted: control (CON), ferulic acid (FA, single dosage of 85.1 g/animal) and ethyl ferulate (EF, single dosage of 85.1 g/animal). Rumen fluid, blood and urine were sampled on 12, 12 and 24 h period, respectively. Concentrations of FA in EF collected samples were determined in ruminal fluid, blood stream and urine in schedules different for 3 periods by HPLC. Data were analyzed in a duplicate heifers 3 × 3 Latin square. The peaks corresponding to the FA and EF concentration appeared at 0.5 h, 15 min and 4 h after dosage, for ruminal fluid, blood stream and urine, respectively. FA and EF disappeared at 12 h in ruminal fluid and blood stream, and 24 h after dosage for urine. The fate of disappearance for the treatments in each body fluid were ruminal fluid (AF: -0.4759, FE: -0.250); blood stream (AF: -0.276, FE: -0.276, CON: -0.422); urine (AF: -0.1819, FE: -0.0557, CON: -0.0800). FA and EF were efficiently absorbed by rumen and were rapidly excreted in urine.



CONTENIDO

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE GRÁFICAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Producción de Carne Bovina en México.....	3
Beta Agonistas.....	8
Ácido Ferúlico, Obtención y Usos.....	9
Ácido Ferúlico en Producción Animal.....	12
Metabolismo del Ácido Ferúlico en Rumiantes.....	14
Cinética del Ácido Ferúlico.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Animales y Tratamientos.....	18
Alimentación de los Animales.....	19
Variables a Evaluar y Toma de Muestras.....	19
Líquido ruminal.....	19
Sangre.....	22
Orina.....	22
Análisis de laboratorio.....	22
Análisis Estadístico.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
Líquido Ruminal.....	25
Plasma.....	31
Orina.....	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
LITERATURA CITADA.....	44



LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición de la dieta experimental.....	20
2	Horario y volumen de muestreo para líquido ruminal, sangre y orina.....	21



LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Inventario de bovinos en México 2007-2013.....	4
2	Exportación de bovinos en México 2010-2014.....	6
3	Exportación de bovinos del Estado de Chihuahua 2000-2008..	7
4	Concentraciones de ácido ferúlico (AF) y ferulato de etilo (FE) en líquido ruminal, en los tratamientos experimentales.....	26
5	Tasa de desaparición del ácido ferúlico en líquido ruminal.....	27
6	Tasa de desaparición del ferulato de etilo en líquido ruminal...	29
7	Concentraciones de ácido ferúlico (AF) y ferulato de etilo (FE) en plasma, en los tratamientos experimentales.....	32
8	Tasa de desaparición del ácido ferúlico en plasma.....	33
9	Tasa de desaparición del ferulato de etilo en plasma.....	34
10	Tasa de desaparición del ácido ferúlico (AF) y ferulato de etilo (FE) en plasma en el grupo control.....	36
11	Concentraciones de ácido ferúlico (AF) y ferulato de etilo (FE) en orina, en los tratamientos experimentales.....	38
12	Tasa de desaparición del ácido ferúlico en orina.....	39
13	Tasa de desaparición del ferulato de etilo en orina.....	40
14	Tasa de desaparición del ácido ferúlico (AF) y ferulato de etilo (FE) en orina en el grupo control.....	42



LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del ácido ferúlico (A) y ferulato de etilo (B).....	10



INTRODUCCIÓN

Por el alto nivel nutricional, la carne de bovino forma parte de la dieta integral en la alimentación de los mexicanos (Rubio *et al.*, 2012). Los mercados nacionales e internacionales demandan carne con una mayor calidad e inocuidad alimentaria (Bandugula *et al.*, 2015). Esto es difícil de lograr debido al uso no controlado de antibióticos, hormonas, aditivos, entre otros. Lo cual ha puesto en duda la inocuidad de la carne y su comercialización nacional e internacional (SAGARPA, 2006).

Los productos sintéticos más utilizados en la finalización de corral de engorda son los beta agonistas, derivados de la epinefrina y norepinefrina (Genicot *et al.*, 1995). Estos disminuyen la degradación de proteína muscular y la tasa de retorno, lo que aumenta la síntesis de proteína muscular promoviendo un crecimiento rápido del músculo. Esta situación promueve significativamente la eficiencia durante la parte terminal de la engorda (Wheeler y Koohmaraie, 2014). Sin embargo, se ha observado una disminución del marmoleo en la carne, además de poner en riesgo la inocuidad alimentaria de esta (Montgomery *et al.*, 2009).

Una alternativa es el uso de Ácido Ferúlico (AF) y sus derivados, sustancias naturales obtenidas del proceso de nixtamalización del maíz. La importancia de este producto comienza a partir de conocer sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, observadas en roedores (Ouand y Kwouk, 2004). Posteriormente, investigaciones en ovinos mostraron que la elevada solubilidad en agua y bajo peso molecular de este compuesto, facilita la rápida absorción ruminal (Soberon *et al.*, 2012a), aparición en sangre y leche de



bovinos, así como su eficiente eliminación del cuerpo, principalmente a través de la orina (Soberon *et al.*, 2012b). Estudios adicionales indican que este compuesto tiene una estructura química similar a los β -agonistas y que estimula los receptores miogénicos, por lo cual puede funcionar como un anabólico natural (Platt *et al.*, 2013).

Sin embargo, en bovinos productores de carne no existe información sobre la cinética de este compuesto. El objetivo fue confirmar la hipótesis de la eficiente absorción y eliminación sistémica de este compuesto, extendiendo así el conocimiento sobre esta molécula, con el fin de proporcionar las bases para el uso de este compuesto como estimulante natural del crecimiento en bovinos de carne.



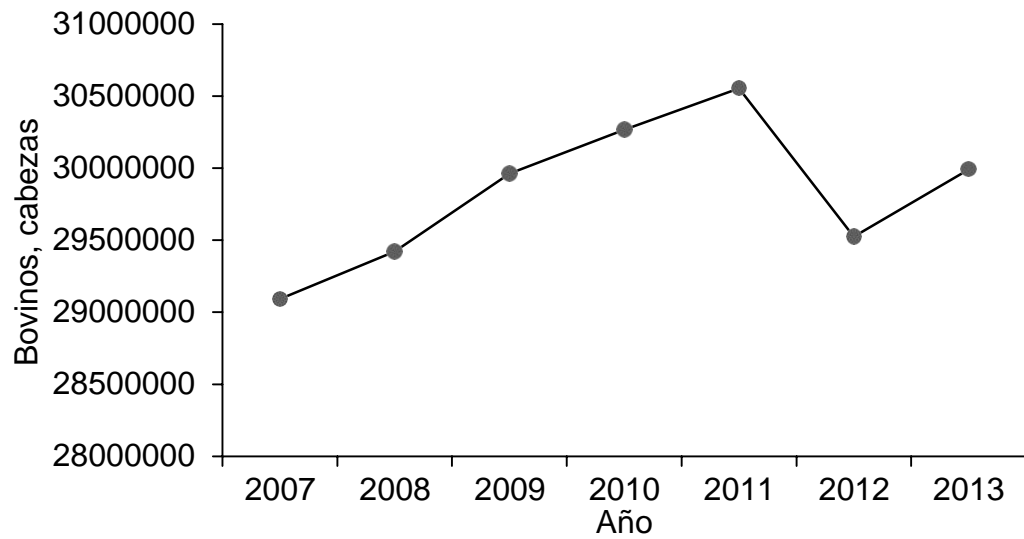
REVISIÓN DE LITERATURA

Producción de Carne Bovina en México

La carne de bovino es una de las más consumidas en México por su sabor y valor nutricional (FIRA, 2012). Representa una fuente de nutrimentos como proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y ácidos grasos (Rubio *et al.*, 2012). Para el 2011, el consumo de carne en México ascendió a 1.9 millones de toneladas, siendo el consumo per cápita de 17 kg por habitante. De esta carne se importaron 251 mil toneladas y se exportaron 113 mil toneladas, siendo en su mayoría carne fresca o refrigerada (FIRA, 2012). Por ende, en México la ganadería es una de las principales actividades económicas, ya que representa el 1.24 % del producto interno bruto nacional y ha tenido una tasa media de crecimiento anual de 3.5 % de 1993 a 2010 (González, 2011).

Para el año 2007 se contaban con 1.13 millones de unidades de producción bovina (FIRA, 2012). El inventario de ganado de carne en México era de 29,091,311 cabezas y se comportó de manera favorable aumentando cada año hasta el 2011. Sin embargo, tuvo una disminución del 3.5 % (Gráfica 1) en 2012 (SIAP, 2014) a causa de la sequía, lo que provocó un aumento del 30 al 40% en el costo de los animales para engorda y producción de carne, extendiéndose estas condiciones hasta el 2014 (FINA, 2014).

Actualmente la producción de ganado de carne es de 7 millones de cabezas anuales aproximadamente, destinándose al abasto nacional y al mercado de exportación (FIRA, 2012). Siendo este último un mercado potencial ya que hasta 2012 se exportaban más de un millón de cabezas anuales. Sin embargo, disminuyó un 45 % para 2013, lo que se puede atribuir como una



Gráfica 1. Inventario de bovinos en México 2007-2013 (SIAP, 2014).

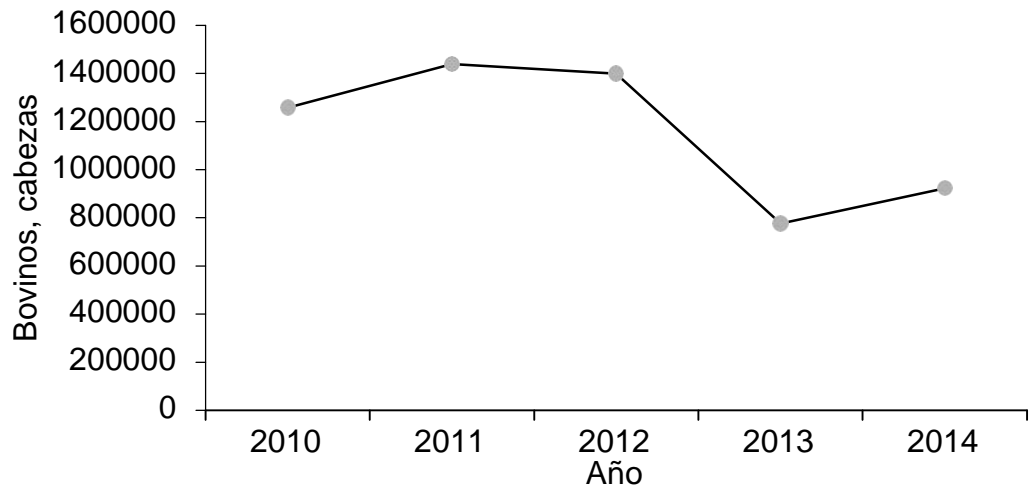


consecuencia al descenso del inventario ganadero en 2012, pero la tendencia actual en exportación (Gráfica 2) va en aumento (SENASICA, 2015).

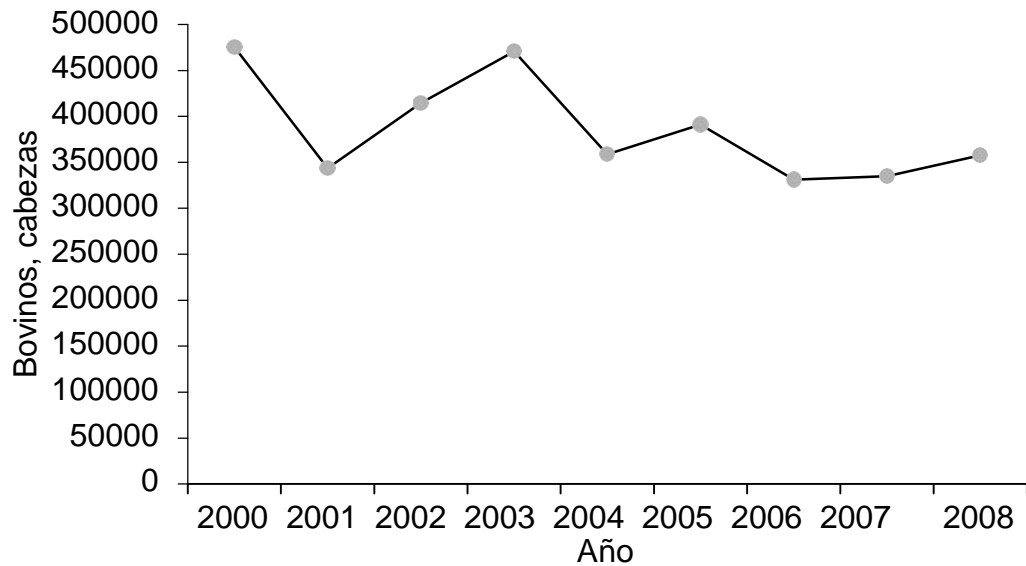
Chihuahua es uno de los principales Estados exportadores de ganado a los EE. UU., exportando en el 2000 y 2008 entre 475,191 y 331,010 cabezas de ganado respectivamente (Gráfica 3), observando una tendencia decreciente, resultado de la disminución en el inventario ganadero (SIAP, 2009).

El ganado que no es exportado se desarrolla y engorda bajo diversos sistemas de producción: extensivo, semi intensivo e intensivo (FIRA, 2009) para comercializarlo dentro del abasto nacional. La producción intensiva es desarrollada en corrales de engorda, donde se implementan programas exitosos de alimentación, sanidad y manejo, incorporando modernas herramientas biotecnológicas, que promueven una eficiente producción y calidad de la carne (Elam *et al.*, 2009). Este proceso cuenta con varias etapas que incluyen: acopio del ganado, recepción, desarrollo y finalización. En el acopio se deben tomar en cuenta factores como: raza, peso de entrada, sexo, etc., para su lotificación (Clifton *et al.*, 2001), para posteriormente proceder al manejo de los animales: vacunación, desparasitación, implantación, castración, entre otras (SAGARPA, 2006).

Durante la recepción, el ganado es alimentado con dietas ricas en forraje y bajo contenido en grano para evitar problemas metabólicos (acidosis, timpanismo) (Delmore *et al.*, 2010). Las fases de desarrollo y finalización del ganado implican el uso gradual de mayores cantidades de concentrado. Finalmente la fase de finalización es una etapa crítica que requiere el uso de aditivos que mejoren la eficiencia alimenticia (Elam *et al.*, 2009). Un ejemplo de



Gráfica 2. Exportación de bovinos en México 2010-2014 (SENASICA, 2015).



Gráfica 3. Exportación de bovinos del Estado de Chihuahua 2000-2008 (SIAP, 2009).



ellos es el uso de β -agonistas, los cuales están muy difundidos en los programas de engorda (Domínguez-Vara *et al.*, 2009).

Beta agonistas

Los β -agonistas fueron aprobados por la US Food and Drug Administration (FDA) en agosto del 2006 y fue hasta en Mayo de 2007 cuando estuvieron a la venta como productos comerciales en Estados Unidos de Norteamérica (Delmore *et al.*, 2010). Estos compuestos aumentan la síntesis de proteína muscular promoviendo un crecimiento rápido del músculo, lo que mejora significativamente la eficiencia durante la parte terminal del período de engorda (Wheeler y Koochmaraie, 2014), y explica el mayor contenido de proteína en las canales (Delmore *et al.*, 2010).

En un estudio con novillos suplementados con zilpaterol a una dosis de 0.14 g/kg de peso vivo, tuvieron un incremento del 3.1 % en la ganancia de peso y 1.1 % en el rendimiento en canal, así como un mayor tamaño del músculo *Longissimus dorsi*. Por otra parte el espesor de la grasa dorsal y el marmoleo se redujeron en 16 y 9 %, respectivamente comparado contra el grupo control (Castellanos-Ruelas *et al.*, 2006).

Al respecto, Brown *et al.* (2014) suplementaron novillos Holstein con zilpaterol y ractopamina y lo compararon contra un grupo control, encontrando que los animales que recibieron los β -agonistas fueron un 10.7 % más eficientes en conversión alimenticia y tuvieron un aumento del 1 % en rendimiento en canal.

En otra investigación, en donde utilizaron cruza (británicas \times continental) evaluaron diversas dosis de ractopamina (200, 300 y 400 mg) y una



sola de zilpaterol (6.8 g/ton), se observó un incremento del 7 % en el músculo *Longissimus dorsi* y un aumento del 3 % en el rendimiento en canal, en los tratamientos de 400 mg de ractopamina y zilpaterol, respectivamente. Así mismo encontraron una reducción del marmoleo en los tratamientos de 300 mg de ractopamina y zilpaterol (Arp *et al.*, 2014).

Sin embargo estos aditivos fueron prohibidos en la Unión Europea desde 2006 como una medida preventiva a problemas en salud pública e inocuidad alimentaria (Castellanos-Ruelas *et al.*, 2006). Debido a ello la tendencia en los mercados de exportación de la carne está dirigida hacia el uso de aditivos de origen natural.

Ácido Ferúlico, Obtención y Usos

Es un compuesto fenólico derivado del ácido cinámico, la estructura química (Figura 1) es 3-4-hidroxi-3-metoxifenil-2-propenóico (Soberon *et al.*, 2012a). Es extremadamente abundante en la naturaleza, principalmente en plantas con gran contenido de fibra, como los pastos donde se encuentra formando parte de la pared celular (Hatfield *et al.*, 1999). La biosíntesis natural de este compuesto se da por la vía del aminoácido fenilalanina y actúa como unión entre lignina y carbohidratos estructurales (Knot *et al.*, 1991). La unión del AF a los carbohidratos se da mediante un enlace ester entre el grupo carboxilo del AF y el carbono 5 de los arabinoxilanos, mientras que en la lignina se da por la unión con los monolignoles (coniferil, feruloil y sinapil alcohol) mediante un enlace éter, por lo cual es tomado como un centro de nucleación para formación de lignina (Hatfield *et al.*, 1999).

Además es el compuesto más abundante e inhibitorio de la digestión de

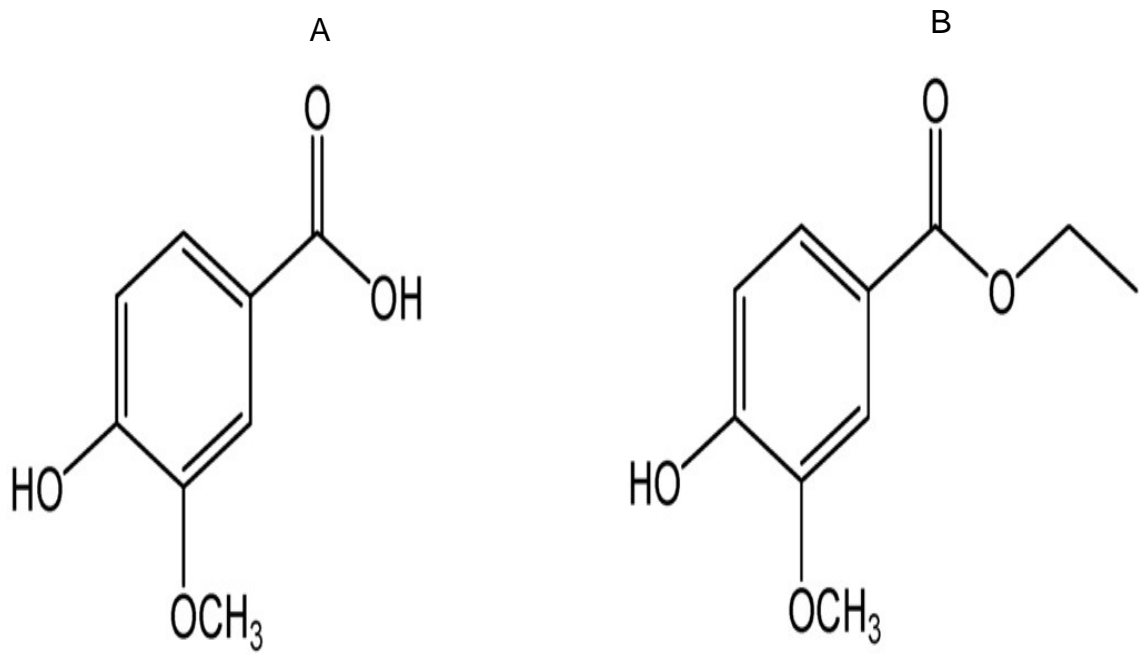


Figura 1. Estructura química del ácido ferúlico (A) y ferulato de etilo (B)



la fibra por la unión a los carbohidratos estructurales (Yu *et al.*, 2005), debido a ello se considera como una sustancia anti-nutricional ya que afecta la disponibilidad de carbohidratos, proteínas y minerales, limitando el aprovechamiento y la respuesta productiva de los rumiantes (Chung *et al.*, 1998). En las plantas actúa no solo como precursor de la lignina si no que es considerado como una barrera contra patógenos por lo cual funciona como un protector natural en las plantas (Bourne y Rice-Evans, 1998). Esto se da debido a su potente acción fungicida y antibacterial (Barber *et al.*, 2000).

Al respecto, Schaller *et al.* (2000) en un estudio *in vitro* encontraron que el AF muestra efecto bacteriostático y bactericida sobre algunas bacterias patógenas tales como *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Además evaluaron el efecto del AF en diferentes concentraciones encontrando la mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida, sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* (1100 y 5000 µg/ml), *Escherichia coli* (100 y 2500 µg/ml), *Listeria monocytogenes* (1500 y 5300 µg/ml) y *Pseudomonas aeruginosa* (100 y 500 µg/ml, respectivamente).

Además se ha observado que después de la exposición al AF se modifica la carga superficial de la membrana, luego al pasar este por difusión pasiva, modifica la estructura de la membrana celular volviéndola permeable y acidificando el citoplasma, lo que desnaturaliza proteínas, esto explica el modo de acción antimicrobial, por lo cual puede ser utilizado en la conservación de alimentos (Borges *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha comprobado un efecto mínimo en bacterias ácido lácticas, por lo cual no afecta la fermentación de productos lácteos (Rosenthal *et al.*, 1997).



En la actualidad el AF es obtenido de una variada gama de subproductos de origen vegetal con alto contenido de fibra tales como cascarillas de avena, arroz, entre otros (Yu *et al.*, 2005). Sin embargo, en México se obtiene a partir del nejayote, el cual es el residuo del proceso de la nixtamalización del maíz con un rendimiento del 0.67 % (Navarro-Ocaña *et al.*, 2009).

En la industria, el AF es utilizado ampliamente como precursor de la vainilla, como base para filtrar rayos ultravioleta, en la producción de cremas anti-envejecimiento y otros cosméticos (Asaff *et al.*, 2008). Además puede ser utilizado como producto antioxidante, colorante y conservador de productos alimenticios (Connell y Fox, 2001). En un estudio se evaluó la capacidad antioxidante del AF a diferentes temperaturas, en él no se observó efecto alguno, lo cual sugiere que el modo de acción es por captación de radicales libres a través de los grupos hidroxilo que contiene (Kikuzaki *et al.*, 2002). Posteriormente se observó que posee un efecto citotóxico en las células T por lo que se utiliza en terapia contra células cancerígenas (Chiung-Chi *et al.*, 2013).

Ácido Ferúlico en Producción Animal

Existe limitada información sobre el uso del AF en animales, pero se ha observado que una infusión de AF eleva significativamente los niveles de la hormona del crecimiento y prolactina en ganado lechero, ello sugiere que puede tener un efecto como promotor de crecimiento, o bien sobre la producción de leche (Gorewit, 1983). Los mecanismos de acción de los β -agonistas implican la regulación miogénica de las células satélite en las fibras musculares (Avendaño-Reyes *et al.*, 2006) provocando la proliferación y diferenciación



(Allen *et al.*, 1984).

En un estudio realizado por Herrera *et al.* (2011) donde se suplementaron cerdos con ractopamina (5 ppm), y AF (12 y 15 ppm), encontraron un comportamiento similar entre los tratamientos de 15 ppm de AF y ractopamina en variables como GDP, rendimiento en canal y CA; siendo la dosis de 12 ppm de AF la que obtuvo menor respuesta productiva.

Por otra parte, en un estudio conducido con bovinos productores de carne en la fase de finalización, González-Ríos *et al.* (2013) compararon el uso de AF (240 ppm) a 30 y 60 d contra zilpaterol (6 ppm) durante un periodo de alimentación de 30 d, y encontraron un comportamiento similar en la GDP y rendimiento en canal cuando se suplementaron AF (30 días) y zilpaterol. También reportaron que la resistencia al corte fue menor y las características sensoriales como jugosidad, terneza y sabor fueron mejores, además de que la carne tuvo una mayor vida de anaquel, conservando el color rojo por más días para AF, lo cual es una característica deseable en el mercado (González-Ríos *et al.*, 2013).

Por otra parte, Platt *et al.* (2013) evaluaron distintas dosis de AF (0.01 μm , 1 μm , 10 μm) y zilpaterol (1 μm , 10 μm) en células satélite cultivadas *in vitro* durante 96 h, las cuales fueron cosechadas para realizar un análisis de RNAm. En este estudio se evaluaron los genes AMP-proteína α kinasa activada, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, factor-I de crecimiento de insulina, cadena de miosina-I, cadena de miosina-IIA, cadena de miosina-IIX. El tratamiento 10 μM AF fue similar a los tratamientos zilpaterol 1 μM y 10 μM , para la AMP- proteína α kinasa activada, receptor β 1 adrenérgico,



receptor β_2 adrenérgico, factor de crecimiento de la insulina y cadena de miosina IIA, por lo cual el AF estimula de manera similar a los β -adrenérgicos la proliferación de células satélite bovinas y justifica la necesidad de desarrollar investigación adicional *in vivo*.

El estímulo del AF en los receptores miogénicos eleva la perfusión sanguínea y consecuentemente la disponibilidad de nutrientes, lo cual aunado a cambios en la transcripción de ARN explica el incremento en la formación de proteínas musculares (Domínguez-Vara *et al.*, 2009)

Metabolismo del Ácido Ferúlico en Rumiantes

Existe limitada información sobre la absorción, distribución y excreción de los compuestos fenólicos en animales (Manach *et al.*, 1995), así como su biodisponibilidad para el organismo ya que diversos factores están involucrados en la absorción del AF y FE (Bourne y Rice-Evans, 1998). Dentro de ellos se consideran las barreras biológicas (degradación por microflora y enzimas), lo cual puede explicar una baja recuperación del compuesto o simplemente la transformación en otros compuestos de menor peso molecular (Choudhury *et al.*, 1999). Tomando en cuenta que este compuesto se encuentra unido a carbohidratos estructurales y lignina para ser liberado en rumen es necesaria una hidrólisis enzimática (Chesson *et al.*, 1999). Algunas de las bacterias ruminales que liberan AF que se encuentra unido a carbohidratos estructurales son *Fibrobacter succinogenes*, *Butrivibrio fibrosolvens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacteroides succinogenes*, *Streptococcus bovis* y *Wolinella Succinogenes* (Soberon *et al.*, 2012a). Estas bacterias liberan enzimas que degradan la pared celular, hidrogenando la unión alquilo (Besle *et*



al., 1995).

La absorción del AF ligado a compuestos lignocelulósicos es dependiente del proceso de liberación enzimática que requiere de un tiempo adecuado de permanencia del alimento en el rumen, el cual en ocasiones es limitado, afectando así la hidrólisis enzimática, la cantidad liberada del compuesto y su absorción (Krause *et al.*, 2003). Sin embargo, una vez liberado es absorbido a través de la mucosa intestinal por el mecanismo de transporte activo dependiente de Na⁺ (Ader *et al.*, 1996).

El AF que no es absorbido, es transformado por algunas bacterias ruminales como *Syntrophococcus syntrophomonas* a ácido 3-propionico-fenol (Chesson *et al.*, 1999). Este compuesto es transportado al hígado y por medio de la β -oxidación es convertido a ácido benzoico (Pagella, 1998). Sin embargo, cuando el AF es ingerido en forma libre es absorbido rápidamente en intestino (Clifford, 2000) y rumen (Soberon *et al.*, 2012b). Esto sugiere que para alcanzar concentraciones altas de este compuesto en la circulación se debe suplementar de manera independiente. El AF en sangre es conjugado mediante los procesos de metilación, sulfatación y glucuronidación, los cuales se llevan a cabo en hígado y riñones (Manach *et al.*, 2004).

En el torrente sanguíneo el AF viaja unido principalmente a proteínas plasmáticas como la albúmina. Sin embargo, no se encontró afinidad del AF para la albúmina bovina, por lo cual es necesario investigar a qué tipo de proteínas se une en la circulación de los bovinos (Manach *et al.*, 2004).

Una vez unido a proteínas plasmáticas puede llegar a tejidos periféricos y ejercer sus acciones en el organismo (Bourne y Rice-Evans, 1998).



Posteriormente las vías de eliminación del compuesto son: 1) biliar, en la cual puede ser reciclado siendo reabsorbido una parte del mismo y 2) urinaria, donde sería eliminado ya sea cómo compuesto o sus derivados (Manach *et al.*, 2004).

Un punto importante es que gran parte del AF se queda en el organismo participando en procesos metabólicos. Un estudio en humanos mostró una recuperación del 11 al 25 % de AF y otros metabolitos en orina (Bourne y Rice-Evans, 1998). En un estudio similar, conducido con roedores, se encontró una recuperación de 5.4 y 8.1 %, cuando se administró vía oral e intravenosa, respectivamente (Choudhury *et al.*, 1999).

Cinética del Ácido Ferúlico

El AF es una molécula de bajo peso molecular y soluble en agua, lo que facilita su eficiente absorción a nivel ruminal, y por lo tanto su aparición en el torrente sanguíneo y en tejidos periféricos es rápida (Soberon *et al.*, 2012b). Lo antes mencionado puede tener implicaciones satisfactorias, considerando su propiedad antiinflamatoria, antioxidante, entre otras (Ouand y Kwok, 2004; Kikuzaki *et al.*, 2002). Un estudio en humanos encontró el pico máximo de concentración en orina a las 7 h post alimentación, y concluyó que por su tiempo de permanencia en circulación general posee una buena propiedad farmacocinética (Bourne y Rice-Evans, 1998).

Soberon *et al.* (2012a) suplementaron tres niveles de AF (3, 6 y 9 g/d) en ovinos durante 5 días, y encontraron que la excreción en orina ocurrió en un promedio de 5 h. En otro estudio realizado en bovinos productores de leche se encontró que el pico de AF apareció a los 30 min, 15 min y 2.75 h post



dosificación en líquido ruminal, plasma, orina y leche, respectivamente, disminuyendo a niveles basales a las 4, 5.5, 10 y 14 h post dosificación, respectivamente (Soberon *et al.*, 2012b).



MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en la Unidad Metabólica para Rumiantes de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Las condiciones experimentales de los animales se apegaron a las normas oficiales mexicanas: NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio; NOM-051-ZOO-1995 Trato humanitario en la movilización de animales, NOM-033-ZOO-1995 Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres; NOM-061-ZOO-1999 Especificaciones de los alimentos para consumo animal; NOM-059-ZOO-1997 Especificaciones de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos.

Animales y Tratamientos

Se utilizaron 6 vaquillas de la craza comercial entre las razas Hereford × Angus, fistuladas en rumen, con una edad promedio de 12 meses y un peso inicial de 340 ± 10 kg. Estas fueron vacunadas con bacterina triple bovina (Bio-ZOO®), desparasitadas interna y externamente con Iverfull (Aranda®) y recibieron: 2,000,000 UI de vitamina A, 300,000 UI de vitamina D y 200 mg vitamina E (Vigantol ADE fuerte, Bayer®) al inicio del experimento.

Los animales fueron sorteados aleatoriamente dentro de cada tratamiento y alojados en corraletas individuales para cada grupo experimental. Los tratamientos fueron: Control (CON; dieta basal), Ácido Ferúlico (AF; dosis única de 85.1 g/animal de AF + dieta basal), Ferulato de Etilo (FE; dosis única de 85.1 g/animal de FE + dieta basal). El AF y FE (99 % pureza) fueron proporcionados por Laboratorios Minkab, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco,



México (Patente WO 2004/110975 A1).

Alimentación de los Animales

El alimento fue ofrecido *ad libitum* dos veces al día (0800 y 1600 h). Se ajustó a un rechazo del 5 al 10 %. La dieta consistió en una relación forraje concentrado de 20:80. El forraje utilizado fue paja de triticale. El concentrado se elaboró semanalmente con base en maíz rolado e ingredientes regionales (Cuadro 1). El concentrado tuvo 1.919 y 1.272 Mcal/kg de MS de EN_m y EN_g, respectivamente; con un contenido de 9.708 % de PC. Los animales tuvieron acceso a agua limpia y fresca durante todo el día.

Variables a Evaluar y Toma de Muestras

La investigación constó de 3 periodos experimentales con una duración de 8 d para cada uno de ellos, La adaptación se dio en los primeros 7 d de cada periodo. Posteriormente, el día 8 se tomaron muestras de líquido ruminal, sangre y orina a las 0800 h para determinar las concentraciones basales de los aditivos. Luego a las 0830 h se realizó la infusión vía cánula ruminal del respectivo aditivo para cada tratamiento y se tomaron muestras durante las siguientes 24 h tomando como base el muestreo realizado por Soberon *et al.* (2012b), sin embargo, la cantidad de muestreos por día fue menor para algunas variables (Cuadro 2).

Líquido ruminal. Las muestras fueron tomadas vía fístula ruminal y filtradas en una tela de queso. Se tomaron 2 submuestras de 10 ml en cada horario de muestreo (Cuadro 2), las cuales fueron llevadas al laboratorio en donde se centrifugaron a 2500 × g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se congeló a -20.0 °C, para su posterior análisis.



Cuadro 1. Composición de la dieta experimental

Ingredientes	MS (%)
Paja de triticale	19.0
Maíz rolado	67.6
Harinolina	7.1
Melaza	3.0
Premezcla de minerales y vitaminas ¹	1.0
Bicarbonato de sodio	1.0
Carbonato de calcio	0.8
Composición Química Estimada	
Materia seca (%)	89.1
Proteína cruda (%)	9.7
EN _m (Mcal/kg de MS)	1.9
EN _g (Mcal/kg de MS)	1.3
FDN, %	24.2
Calcio (%)	494
Fósforo (%)	412

¹ El producto contiene un mínimo de 12% P, 11.5% Ca, 0.6% Mg, 2,160 ppm Mn, 2,850 ppm Zn, 580 ppm Fe, 1,100 ppm Cu, 102 ppm I, 13 ppm Co, 9 ppm Se, 220,000 UI/kg Vit A, 24,500 UI/kg Vit D₃ y 30 UI/kg Vit E.



Cuadro 2. Horario y volumen de muestreo para líquido ruminal, sangre y orina

Hora	Tiempo	Líquido Ruminal	Sangre	Orina
0800		Concentraciones basales		
0830		Dosificación del AF y FE		
0845	15 min		X	
0900	30 min	X	X	
0930	1.0 h	X	X	
1000	1.5 h	X	X	
1030	2.0 h			X
1100	2.5 h	X		
1130	3.0 h		X	
1200	3.5 h	X		
1230	4.0 h			
1300	4.5 h		X	
1430	6.0 h		X	X
1630	8.0 h			X
1730	9.0 h		X	
2030	12 h	X	X	X
0030	16 h			X
0230	18 h			
0430	20 h			X
0830	24 h			X
		N=7	N=10	N=9



Sangre. Las muestras fueron colectadas mediante punción yugular (vacutáiner con Heparina sódica, EDTA). Se colectaron 2 submuestras (8 ml) en diferentes horarios (Cuadro 2). Las muestras se centrifugaron a $2500 \times g$ durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se tomaron 2 ml de plasma, los cuales fueron hidrolizados en dos ocasiones: 1) hidrólisis alcalina, para ello se utilizaron 2 ml NaOH (2 M), las muestras se agitaron durante 4 h; y 2) hidrólisis ácida, para lo cual se usaron 388 μl de HCl (12 M), para ajustarse a un pH de 4-7. Dichas muestras fueron congeladas para su posterior análisis.

Orina. Se utilizó una sonda Foley (Silastic 2 vías G-5 FR 20) para tomar la muestra directamente de vejiga urinaria. Se tomaron 2 submuestras de 10 ml en diferentes horarios (Cuadro 2). Las muestras fueron centrifugadas a $2500 \times g$ durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después las muestras de orina fueron hidrolizadas de la misma manera que las muestras de sangre para ser congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y ser almacenadas hasta su posterior análisis.

Análisis de laboratorio. El análisis de las muestras se realizó en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, en las instalaciones del laboratorio MinKab S.

A. de C. V., mediante el método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC Varian ProStar; Varian Inc., Palo Alto, CA) descrito por Soberon *et al.* (2012b), utilizando una columna (Supelcosil® LC-ABZ Cat#59142 25cm \times 4.6mm, 5 μm), de acuerdo al siguiente protocolo:

1) Curva de calibración: primeramente se prepararon los estándares para la curva de calibración con una solución madre (1000 ppm de ácido ferúlico en Acetonitrilo HPLC J. T. Baker®). Posteriormente se pesaron 6 matraces de 100 ml con diferentes cantidades de solución madre (1, 2.8, 4.6, 6.4, 8.2 y 10 g) y se



aforaron a 100 ml con la solución 2 (Agua-ácido fosfórico RA ACS J. T. Baker® 1000:1 ml). Finalmente estos 6 estándares se filtraron con un filtro de celulosa (Durapore® 0.45 µm HVLPO4700) a viales de 2 ml. El equipo se configuró a un flujo de 1 ml/min a 40 °C, 280-320 nm, con una inyección de 5 µl, los tiempos de elución fueron de 0 a 12 min.

2) Preparación de las muestras. Para orina primeramente se descongelaron las muestras y se tomó lectura del pH ajustándolo a un rango de 2 - 8. Posteriormente se pasaron a través de un filtro de celulosa (Durapore® 0.45 µm HVLPO4700) para colocar 1.5 ml de muestra en un vial. Para líquido ruminal se tomaron 800 µl de solución (H₂O/H₃PO₄, 100:1 ml) y 200 µl de muestra y se colocaron en un microtubo. Finalmente para plasma en un tubo fueron puestos 90 µl de la solución (Metanol HPLC J. T. Baker®-ácido acético RA ACS J. T. Baker® 100:5 ml v/v) mas 50 µl de solución Buffer (acetato de sodio fermont® y ácido acético RA ACS J. T. Baker® con pH 5) y 50 µl de muestra. La muestra se mezcló en un Vortex durante 30 s, posteriormente se pasó a un sonicador por 30 s, para regresar al vortex por 30 s. Finalmente se centrifugó a 5000 × g durante 10 s. Por último el sobrenadante se pasó por un filtro de celulosa (Durapore® 0.45 µm HVLPO4700).

Análisis Estadístico

Para la obtención de medias ajustadas los datos fueron analizados con el procedimiento MIXED del programa estadístico SAS (SAS, 2006) bajo un diseño en cuadrado latino 3 × 3 repetido en renglón. Incluyendo en el modelo el efecto de tratamiento, periodo, repetición, y como variable aleatoria la vaquilla.



Posteriormente, para determinar la tasa de desaparición de AF y FE en líquido ruminal, sangre y orina, se ajustó un modelo exponencial mediante el PROC NLIN (SAS 9.1.3, 2005-2010). El modelo fue el siguiente:

$$y_i = \theta_1 e^{-\theta_2 x_i}$$

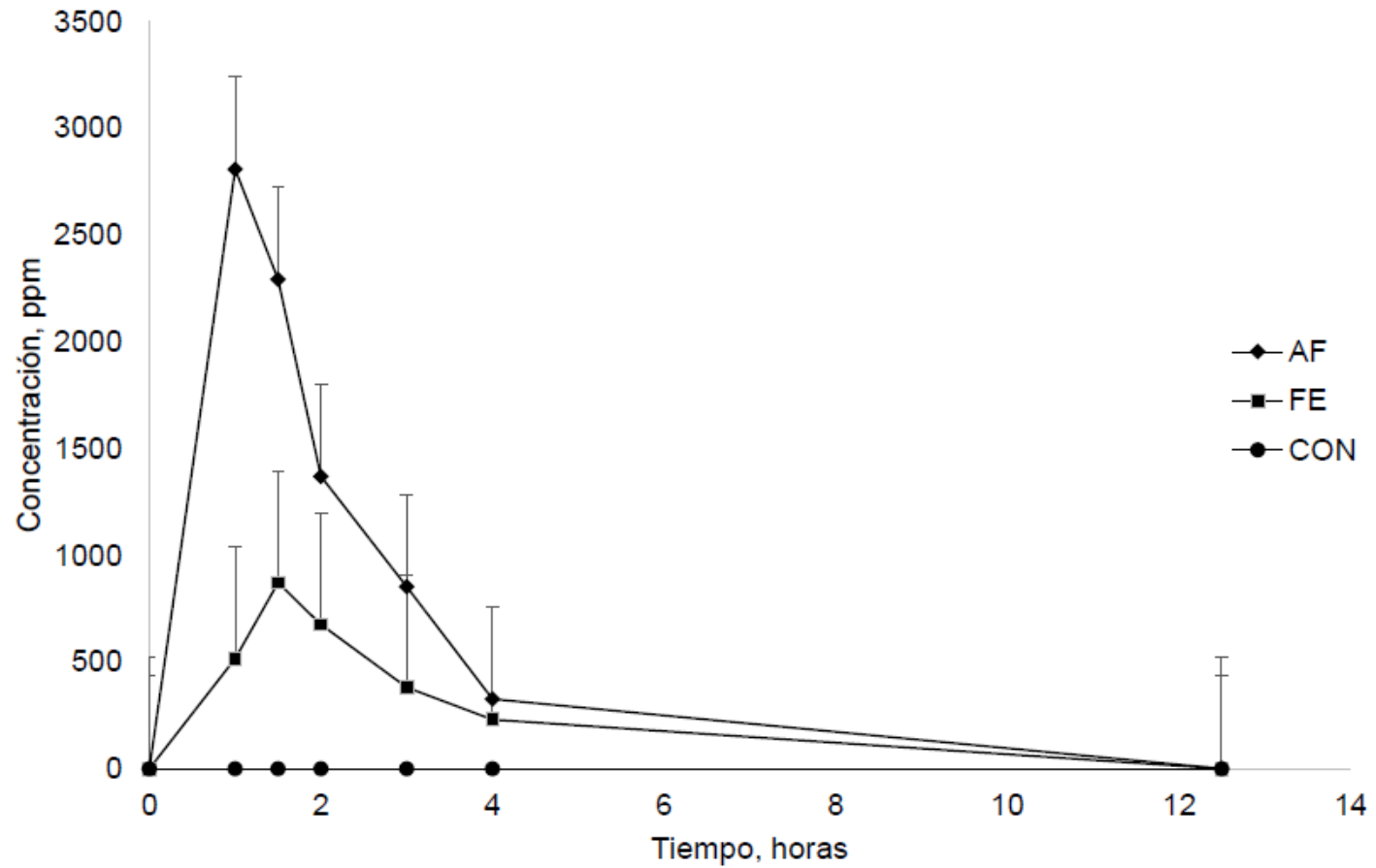
Donde θ_1 y θ_2 son los parámetros de la función. θ_1 es el valor esperado en y_i cuando x_i se aproxima al cero y θ_2 es la tasa de cambio esperada en y_i a través del tiempo (x_i). El algoritmo usado fue el método iterativo de Gauss-Newton con un número de iteraciones fijado en 500 y el criterio de convergencia igual a 0.00001. Los valores iniciales para los parámetros de la función fueron 300 y 0.5 respectivamente. Se realizó la prueba de falta de ajuste cada vez que el modelo fue ajustado a un conjunto de datos.



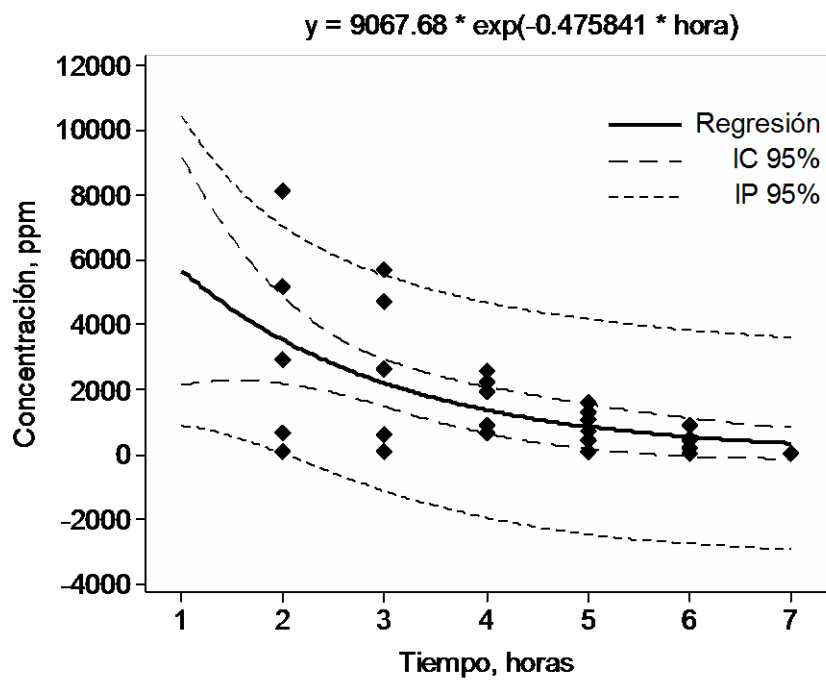
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Líquido Ruminal

La concentración de AF en líquido ruminal se incrementó linealmente, alcanzando la máxima concentración a las 0.5 h post infusión ruminal (Gráfica 4), luego disminuyó rápidamente hasta 3.5 h. Posteriormente, la disminución fue lentamente hasta las 12 h post dosificación en, donde alcanzó el nivel basal. La tasa de desaparición (Gráfica 5) fue de -0.476 ppm/h. Resultados similares fueron reportados por Soberon *et al.* (2012b) en relación al tiempo de la máxima concentración de AF en líquido ruminal después de la dosificación en ganado lechero. Sin embargo, en ese estudio el retorno de la concentración de AF en rumen a niveles basales fue entre 3 y 4 h post dosificación (Soberon *et al.*, 2012b). Los resultados obtenidos en el presente experimento y en aquellos conducidos por Soberon *et al.* (2012a) y Soberon *et al.* (2012b) pueden ser explicados por la elevada solubilidad del AF en el medio acuoso ruminal (85 – 90 % de agua), la cual es exacerbada por la temperatura prevaleciente en el rumen-retículo 38 - 40 °C, particularmente en dietas con alta digestibilidad (Church, 1969). Al respecto, la solubilidad del AF en agua es de $5.97 \times 10 + 3$ mg/l a 25 °C (US EPA, 2004). Lo anterior explica que éste compuesto fenólico se distribuya rápidamente en el líquido ruminal. Las diferencias observadas en los tiempos donde se alcanzó el pico máximo en la concentración de AF y su desaparición ruminal, observado en el presente estudio y en el de Soberon *et al.* (2012b) pueden ser explicados por la mayor capacidad rumen-reticular (Bell y Bauman, 2006) que favorece una mayor capacidad de dilución ruminal y posterior absorción en el epitelio ruminal de ganado lechero de talla corporal



Gráfica 4. Concentración de ácido ferúlico (AF) y ferulato de etilo (FE) en líquido ruminal, en los tratamientos experimentales.



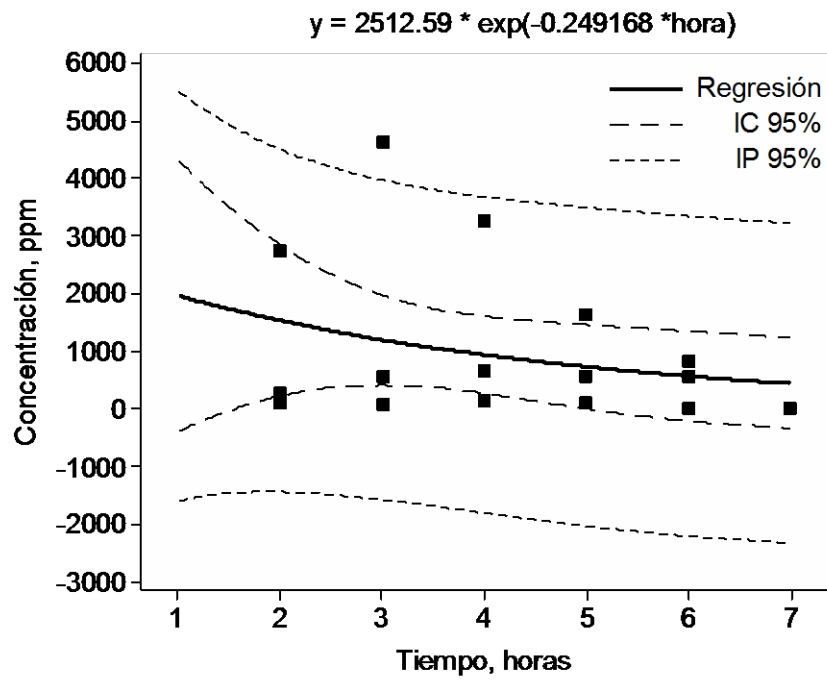
Gráfica 5. Tasa de desaparición del ácido ferúlico en líquido ruminal.



grande en comparación con ganado productor de carne de talla corporal mediana, ya que la capacidad del rumen de un bovino en litros es del 15 al 21 % de su peso vivo (Owens y Goetsch, 1988).

La concentración de FE en líquido ruminal mostró un comportamiento similar al del AF, aunque el pico máximo para este compuesto fue alcanzado a la 1 h post dosificación (Gráfica 4). Posteriormente la concentración de FE disminuyó paulatinamente hasta las 4 h y desapareció a las 12 h post dosificación. La tasa de desaparición del FE en el líquido ruminal fue de -0.250 ppm/h (Gráfica 6). La concentración de FE en todos los tiempos de muestreo fue menor comparada con aquellos de AF. Esto puede ser atribuido a la menor solubilidad de este compuesto fenólico en el ambiente ruminal en comparación con el AF, provocando probablemente un mayor flujo al intestino delgado, un mayor metabolismo por la actividad enzimática microbial del rumen y su transformación en otros metabolitos (Besle *et al.*, 1995), ocasionando una menor absorción a través del epitelio ruminal. La menor solubilidad del FE se asocia a su composición química que difiere del AF en la presencia de un grupo etilo. Sin embargo, el valor de solubilidad del FE no ha sido reportado en la literatura. Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la concentración de FE en líquido ruminal no pueden ser comparados ya que no existe información disponible en la literatura científica.

Por otra parte, en el grupo control no se encontró AF y FE a través de los tiempos de muestreo (Gráfica 4). Estos resultados están en desacuerdo con la hidrólisis enzimática microbial que ocurre en el rumen sobre el AF enlazado a la pared celular de los ingredientes de la dieta que permiten la liberación parcial



Gráfica 6. Tasa de desaparición del ferulato de etilo en líquido ruminal.



del complejo lignina (Manach *et al.*, 2004). Un estudio *in vitro* muestra que algunas de las bacterias ruminales involucradas en la hidrólisis enzimática y liberación del AF unido a complejos lignocelulósicos incluyen a: *Fibrobacter succinogenes*, *Butrivibrio fibrosolvans*, *Streptococcus bovis*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Wollinella succinogenes* (Besle *et al.*, 1995).

Sin embargo, es importante considerar que el proceso de hidrólisis enzimática requiere de la permanencia suficiente del alimento en el rumen (Krause *et al.*, 2003). Este depende parcialmente de la relación forraje: concentrado de la dieta y de la calidad de los forrajes utilizados, asociados principalmente al grado de madurez a la cosecha (Engels, 1989). En este sentido, en el estudio de Soberon *et al.* (2012b) la proporción de forraje utilizado fue de 77.1 % de la MS de la dieta, típico de las dietas utilizadas en vacas lactantes, que indudablemente aseguran tiempos suficientes de permanencia en el rumen con un tiempo medio de retención de 45.4 h (Gorniak *et al.*, 2014), permitiendo una eficiente degradación de los carbohidratos estructurales donde se incluye el complejo lignina. Sin embargo, el contenido de forraje empleado en este estudio fue de 19 % de la MS de la dieta, el cual es común en dietas empleadas en finalización en corral de engorda, y las cuales por el contrario muestran un tiempo medio de retención de 39.5 h (Whetsell *et al.*, 2004) con el impacto negativo en la hidrólisis de celulosa, hemicelulosa y lignina. Por otra parte en este estudio el forraje empleado fue paja de triticale, el cual es altamente lignificado y donde probablemente la lignina es menos susceptible a la acción enzimática microbial comparado con la lignina de forrajes cosechados



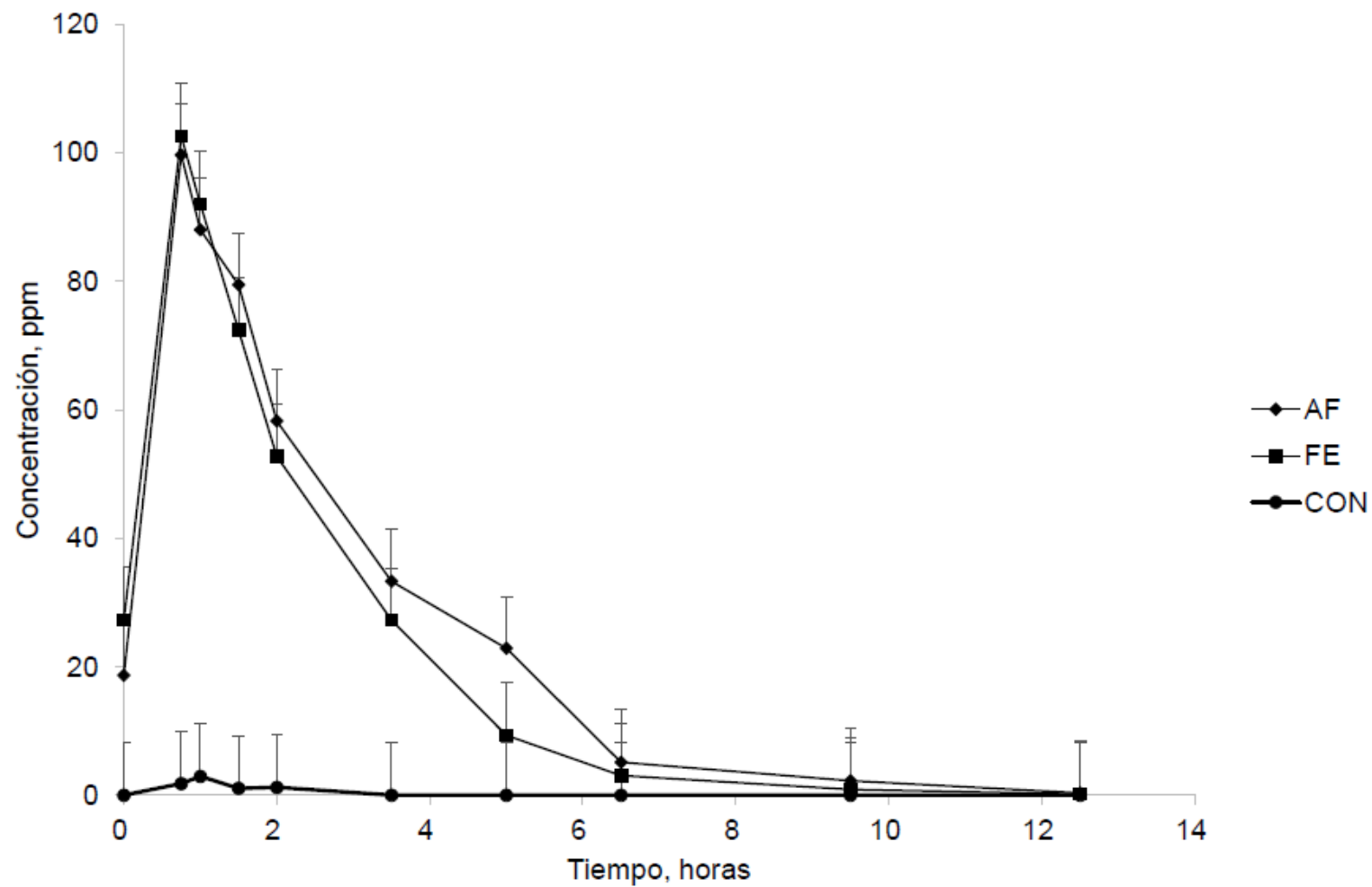
en un estado de madurez más temprano, como los forrajes empleados en el experimento de Soberon *et al.* (2012b).

Adicionalmente, es conocido que bacterias ruminales como *Syntrophococcus syntrophomonas* metabolizan el AF a ácido 3-propionico-fenol (Chesson *et al.*, 1999), el cual es transportado al hígado donde es convertido a ácido benzoico, vía β -oxidación (Manach *et al.*, 2004). Finalmente el AF libre puede ser rápidamente absorbido del medio ambiente ruminal (Clifford, 2000). Potencialmente, todos estos factores discutidos pudieron afectar extensamente la liberación ruminal de AF y/o su absorción en el grupo control, limitando la presencia de este compuesto fenólico en el líquido ruminal.

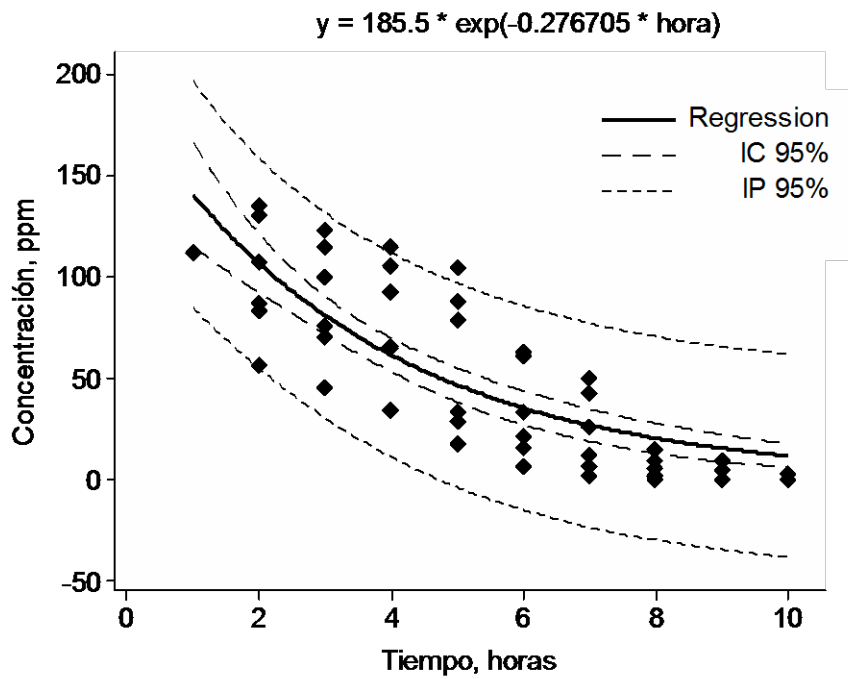
Plasma

La elevada solubilidad del AF (US EPA, 2004), y en menor proporción del FE de un 18 - 70 % a través de los tiempos de muestreo, en el medio acuoso ruminal, y la eficiente absorción a través del epitelio ruminal, condujeron a la inmediata aparición de ambos compuestos en el torrente sanguíneo, alcanzando la máxima concentración a los 15 min post dosificación (Gráfica 7). Posteriormente, la concentración de éstos compuestos disminuyó rápidamente hasta 3 h post dosificación para después descender lentamente hasta las 6 h, retornando a niveles basales a las 12 h post infusión. La tasa de desaparición para AF fue de -0.277 ppm/h (Gráfica 8) y para FE de -0.276 ppm/h (Gráfica 9).

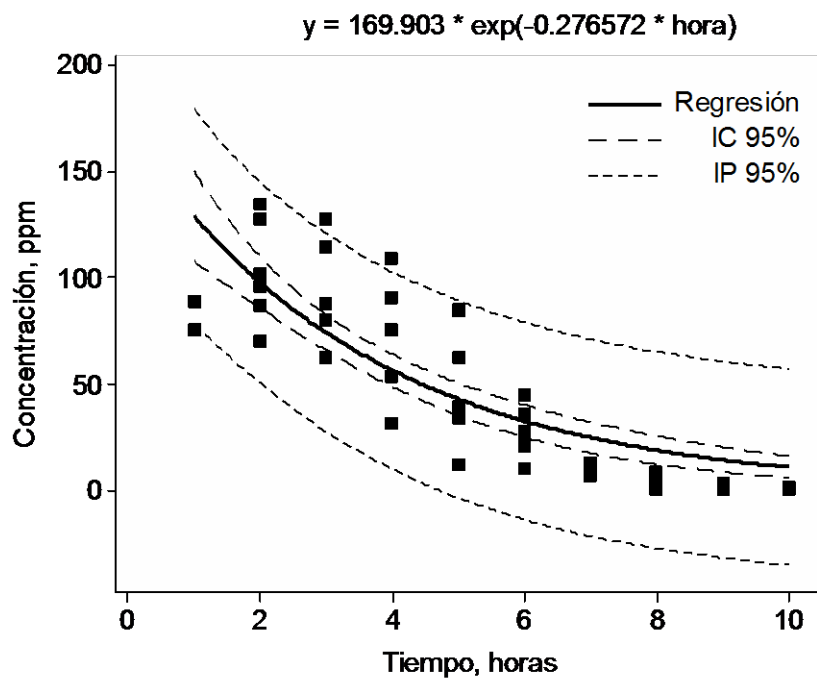
Un patrón similar en la aparición de AF en el torrente sanguíneo fue observado por Soberon *et al.* (2012b), ya que la concentración máxima de AF se alcanzó a los 15 min post dosificación, para luego disminuir paulatinamente hasta desaparecer a las 5.5 h post infusión. La rápida desaparición en sangre



Gráfica 7. Concentración de ácido ferúlico (AF) y ferulato de etilo (FE) en plasma, en los tratamientos experimentales.



Gráfica 8. Tasa de desaparición del ácido ferúlico en plasma.



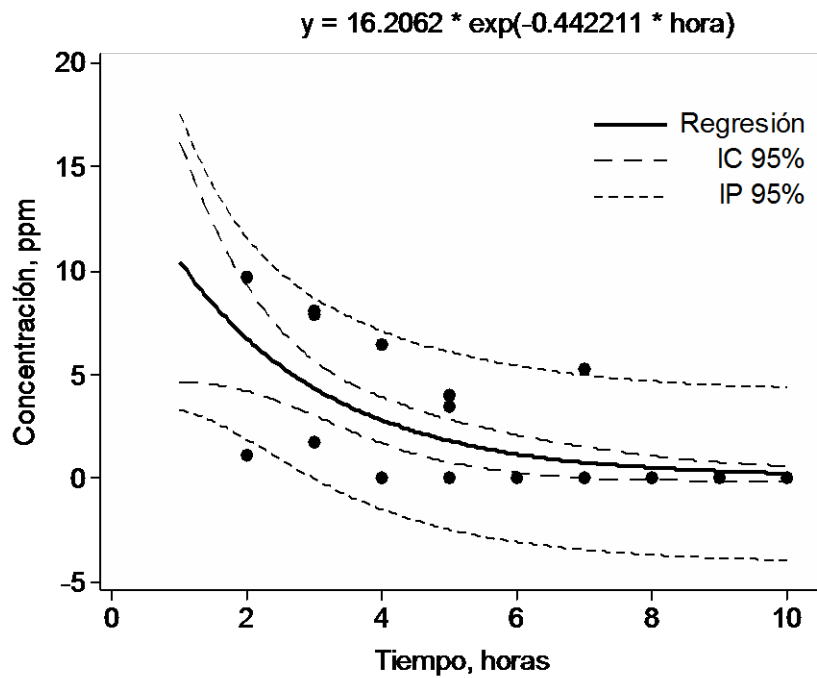
Gráfica 9. Tasa de desaparición del ferulato de etilo en plasma.



de AF en el estudio de Soberon *et al.* (2012b) puede ser explicada por el rápido metabolismo de las vacas lecheras para soportar elevados niveles de producción de leche (Gásque-Gómez, 2008), comparado con las condiciones de producción del ganado de carne en el corral de engorda. Sin embargo, el patrón de aparición de FE y su desaparición de torrente sanguíneo no puede ser contrastado, ya que al momento no existe investigación al respecto en especies de rumiantes, por lo cual es fundamental que se desarrolle investigación adicional.

En el grupo control se observaron concentraciones basales trazas de 1.7 ppm para AF y FE, entre los 15 min y 1 h post dosificación siendo la tasa de desaparición de -0.442 ppm/h (Gráfica 10). De manera similar, en vaquillas dosificadas con AF y FE se encontraron concentraciones basales en sangre de 18.683 ppm y 27.3 ppm, respectivamente. Estos resultados comprueban la liberación del AF enlazado a lignina, mediante enzimas producidas por microorganismos del rumen, así como su rápida absorción y aparición en el torrente sanguíneo (Soberon *et al.*, 2012b). Sin embargo, estos resultados están en contraste con la ausencia de AF y FE en líquido ruminal en el grupo control.

Considerando la rápida aparición de AF y FE en sangre y su tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo de aproximadamente 12 h post infusión, se aseguran los procesos de conjugación en sangre: metilación, sulfatación y glucuronidación (Connell y Fox, 2001), para unirse a proteínas plasmáticas y llegar a los tejidos periféricos donde ejercen sus propiedades farmacocinéticas benéficas (Bourne y Rice-Evans, 1998; Barber *et al.*, 2000). Al respecto, en el



Gráfica 10. Tasa de desaparición del ácido ferúlico (AF) y ferulao de etilo (FE) en plasma en el grupo control.



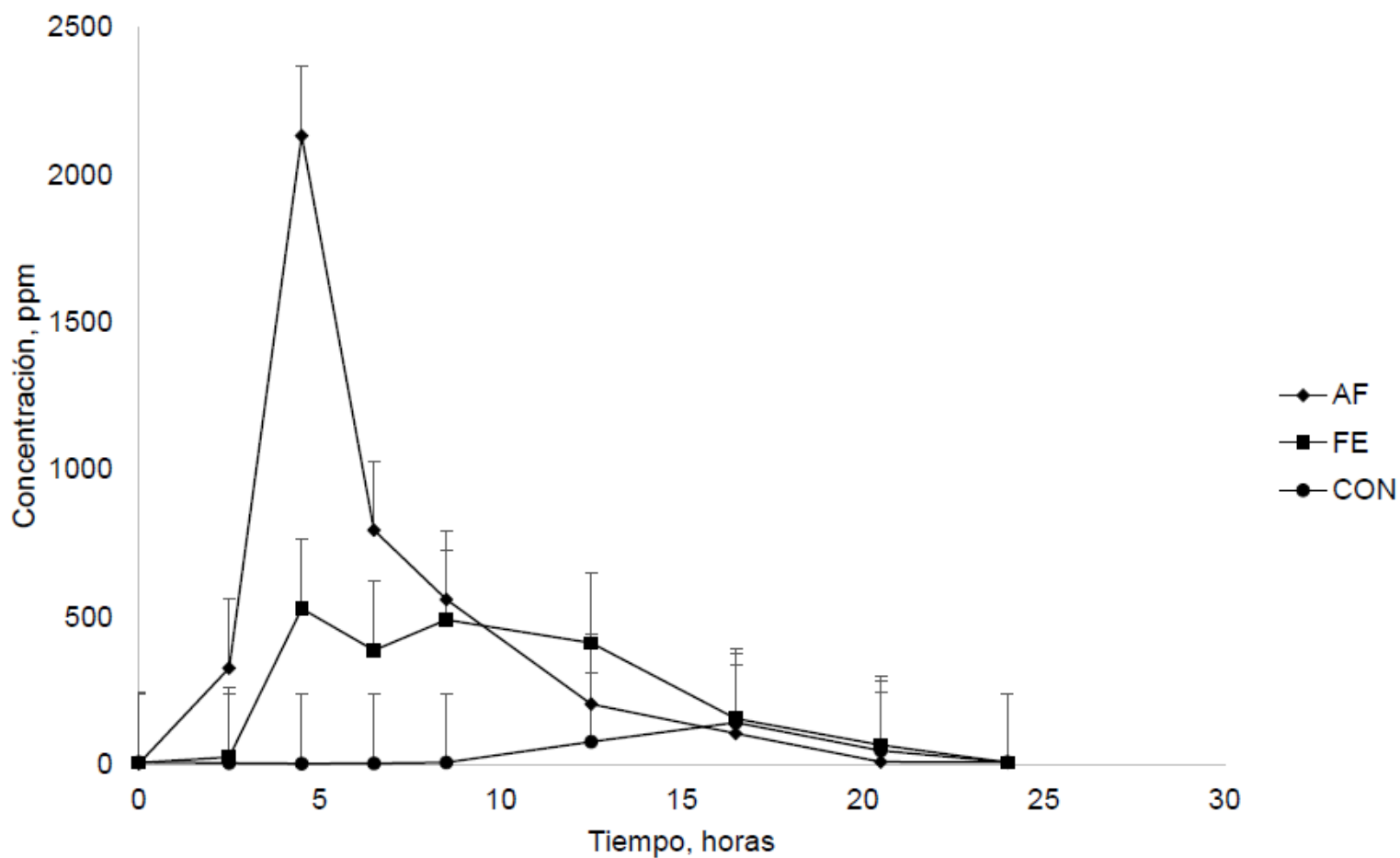
estudio de Soberon *et al.* (2012b) la mayor concentración de AF en leche ocurrió a las 6 h post infusión y retorno a sus concentraciones basales hasta las 14 h. Sin embargo, es necesario investigar la biodisponibilidad del AF en leche.

Orina

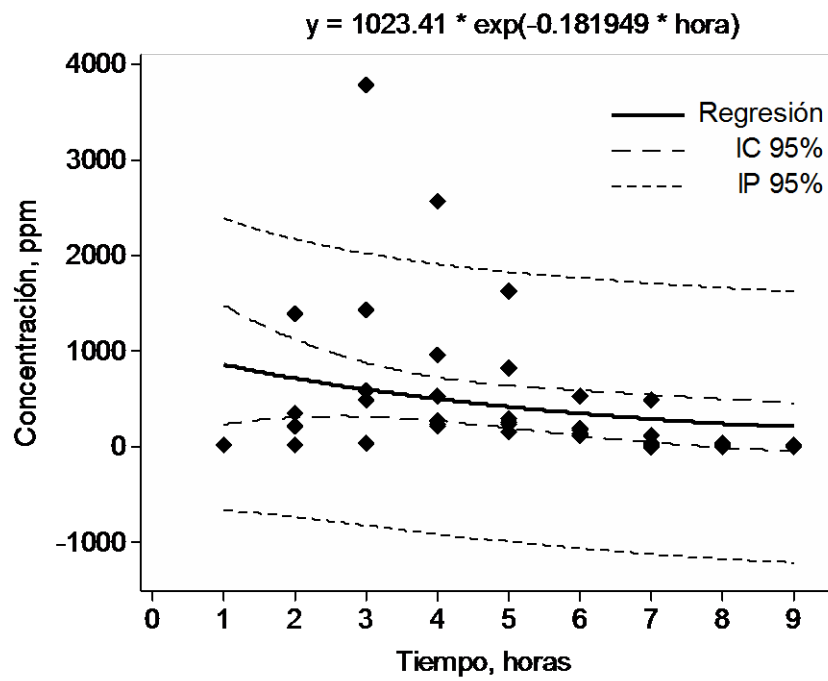
Las concentraciones de AF y FE en orina se incrementaron rápidamente, alcanzando el pico a las 4 h post dosificación (Gráfica 11). Posteriormente, se observó una rápida reducción en la concentración de AF hasta las 6 h post infusión, en cambio la concentración de FE permaneció más estable desde el pico máximo de concentración hasta las 12 h post infusión, posterior a lo cual se inició una lenta reducción para luego desaparecer a las 24 h post dosificación. La tasa de desaparición en orina para AF fue -0.182 ppm/h (Gráfica 12), mientras que para FE fue de -0.056 ppm/h (Gráfica 13).

Una tendencia similar en la excreción de AF en orina fue reportada por Soberon *et al.* (2012b), donde se observó que la máxima concentración fue alcanzada a las 2.75 h post dosificación, posteriormente se redujo rápidamente alcanzando niveles basales a las 10 h después de la infusión. La acelerada desaparición de AF en orina en el estudio de Soberon *et al.* (2012b) con respecto al presente estudio puede atribuirse al elevado flujo sanguíneo a tejidos periféricos (glándula mamaria y sistema renal) de vacas lactantes (Gásque-Gómez, 2008) comparado con ganado de carne en corral de engorda. Por otra parte, la excreción de orina es dependiente del peso vivo en bovinos la cual es de 17- 45 ml/kg/d (Sanidad Animal, 2015).

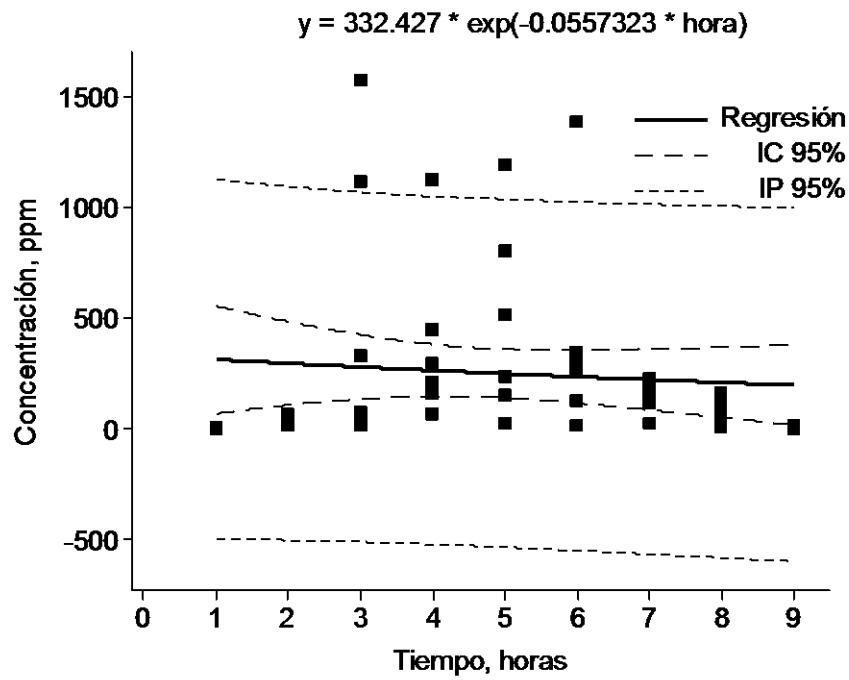
Las mayores concentraciones de AF comparado con FE en orina pueden ser resultado de un intenso metabolismo del FE en sangre y tejidos periféricos,



Gráfica 11. Concentración de ácido ferúlico (AF), ferulato de etilo (FE) y grupo control (CON) en orina, en los tratamientos experimentales.



Gráfica 12. Tasa de desaparición del ácido ferúlico en orina.



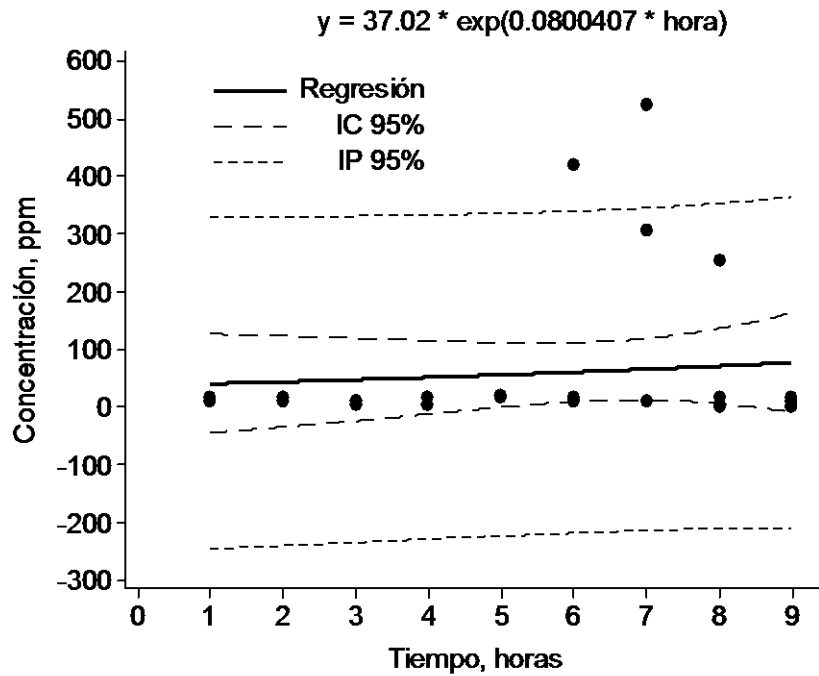
Gráfica 13. Tasa de desaparición del ferulato de etilo en orina.



considerando que las concentraciones de AF y FE fueron similares en sangre a través de los periodos de muestreo (Gráfica 7).

En el grupo control se encontraron concentraciones trazas de 32.6 ppm de AF y FE. La tasa de desaparición en orina para AF y FE fue de -0.080 ppm/h (Gráfica 14). Los polifenoles y sus derivados son eliminados por vía urinaria y biliar, entrando en el reciclaje enterohepático (Manach *et al.*, 2004).

Al respecto, en humanos alimentados con 360 - 728 g de tomate que aportaban aproximadamente de 21 a 44 mg de AF, la máxima concentración en orina fue a las 7 h post alimentación, observandose una recuperación del compuesto ingerido y excretado en orina del 11 - 25 % (Bourne y Rice-Evans, 1998). En roedores, la recuperación del AF en orina fue de 5.4 y 8.1 %, cuando el AF se administró vía oral e intravenosa, respectivamente (Choudury, *et al.*, 1999). En ovinos suplementados con 0, 3, 6, y 9 g de AF la recuperación en orina a las 5 h fue del 0.65, 0.78 y 1.12 %, respectivamente (Soberon *et al.*, 2012a).



Gráfica 14. Tasa de desaparición de ácido ferúlico (AF) y ferulato de etilo (FE) en orina en el grupo control.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El AF y el FE son compuestos de elevada solubilidad en líquido ruminal lo cual facilita su rápida dilución y absorción ruminal, permitiendo su inmediata aparición en el torrente sanguíneo. El tiempo de permanencia del AF y FE en sangre, les permite que alcancen los tejidos periféricos blanco donde podrían ejercer sus beneficios farmacocinéticos. La principal vía de desecho de estos compuestos es la orina, excretándose en un periodo máximo de 24 h post dosificación.

Los resultados obtenidos sobre la rápida eliminación en orina de estos compuestos representan una ventaja cuando se utilizan como aditivos naturales en bovinos, por lo cual se asume que podría contribuir a la inocuidad de la carne.

Sin embargo, la elevada variabilidad observada en el patrón y concentración de AF y FE en líquido ruminal, sangre y orina, puede obedecer a mecanismos de absorción, metabolismo, excreción, mismos que aún no están perfectamente delimitados en la literatura, lo cual implica la necesidad de desarrollar investigación adicional relacionada con el metabolismo de éstas moléculas en el rumen y tejidos periféricos, así como la determinación de los niveles óptimos de suplementación y la respuesta productiva en las diversas especies domésticas de rumiantes, bajo los diferentes sistemas de producción.



LITERATURA CITADA

- Ader, P., B. Grenacher, P. Langguth, E. Scharrer y S. Wolffram. 1996. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol.* 81:943–955.
- Allen, R. E., M. V. Dodson y L. S. Luiten. 1984. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation by bovine pituitary fibroblast growth factor. *Exp. Cell. Res.* 152: 154-160.
- Arp, T. S., S. T. Howard, D. R. Woerner, J. A. Scanga, D. R. McKenna, W. H. Kolath, P. L. Chapman, J. D. Tatum y K. E. Belk. 2014. Effects of dietary ractopamine hydrochloride and zilpaterol hydrochloride supplementation on performance, carcass traits, and carcass cutability in beef steers. *J. Anim. Sci.* 92:836–843.
- Asaff, A., A. Martínez, N. Pérez, Á. Aceves y L. Alejo. 2008. Desarrollo de la cadena de valor de los efluentes de la industria del nixtamal. XIV Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería coordinación. Departamento de investigación y desarrollo, Minkab Mexicana. www.ciad.mx. Consultado 27 Septiembre 2013.
- Avendaño-Reyes, L., V. Torres-Rodriguez, F. J. Meraz-Murillo, C. Perez-Linares, F. Figueroa-Saavedra y P. H. Robinson. 2006. Effects of two β -adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 84:3259-3265.
- Bandugula, V. R., S. S. Allur, W. J. Dawoon, W. Yang-Byung, P. Sang-June, L. So-Young, B. Ji-Yeon, K. Chang-Ho, C. Soo-Hyun y H. Inho. 2015. Beef quality traits of heifer in comparison with steer, bull and cow at various feeding environments. *J. Anim. Sci.* 86: 1–16.
- Barber, M. S., V. S. McConnell y B. S. Caux. 2000. Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. School of Biological Sciences, University of Southampton, Southampton, Inglaterra.
- Bell, W. A. y D. E. Bauman. 2006. Regulation of amino acid metabolism in dairy and beef cattle. Department of animal science Cornell University. 21st Annual Southwest Nutrition & Management Conference.
- Besle, J. M., J. P. Jouany y A. Cornu. 1995. Transformations of structural phenylpropanoids during cell wall digestion. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:33–52.
- Borges, A., C. Ferreira, M. J. Saavedra y M. Simoñes. 2013. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance.*



- Bourne, C. L. y C. Rice-Evans. 1998. Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 253: 222-227.
- Brown, T. R., A. K. Sexten, T. E. Lawrence, M. F. Miller, C. L. Thomas, D. A. Yates, J. P. Hutcheson, J. M. Hodgen y J. C. Brooks. 2014. Comparative effects of zilpaterol hydrochloride and ractopamine hydrochloride on live performance and carcass characteristics of calf-fed Holstein steers. *J. Anim. Sci.* 92:4217–4222.
- Castellanos-Ruelas, A. F., R. J. G. Rosado, G. I. A. Chel y D. A. Betancour. 2006. Empleo del zilpaterol en novillos con alimentación intensiva en Yucatán, México. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 14. 56-59.
- Chesson, A. P., G. J. Provan, W. R. Russell, L. Scobbie, A. J. Richardson y C. Stewart. 1999. Review hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J. Sci. Food Agric.* 79:373–378.
- Chiung-Chi, P., C. Charng-Cherng, W. Hui-Er, C. Chi-Huang, C. Kuan-Chou, C. Kuang-Yu y R. Peng. 2013. Cytotoxicity of ferulic acid on t24 cell line differentiated by different microenvironments. *Biomed Research International*. 2013: 7.
- Choudhury, R., S. K. Srail, E. Debnam y C. A. Rice-Evans. 1999. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. 27: 278–286.
- Chung, K. T., C. I. Wei y M. G. Johnson. 1998. Are tannins a double-edged sword in biology and health. *Trends in Food Science and Technology*. 9:168–175.
- Church, D. C. 1969. Digestive physiology and nutrition of ruminants. Volumen 1. The nature of rumen contents. Oregon State University. Corvallis, Oregon. Pag 144.
- Clifford, M. N. 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food. Agric.* 80:1033–1043.
- Clifton G., J. Cabana, A. Manero y M. Barahona. 2001. Engorda de terneros a corral. Estación experimental agropecuaria. www.produccion-animal.com. Consultado 24 Septiembre 2013.
- Connell, J. E. O y P. F. Fox. 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *J. Dairy Sci.* 11:103–120.



- Delmore, R. J., J. M. Hodgen y B. J. Johnson. 2010. Perspectives on the application of zilpaterol hydrochloride in the United States beef industry. *J. Anim. Sci.* 88:2825–2828.
- Domínguez-Vara, I., J. Mondragón-Ancelmo, M. González-Ronquill, F. Salazar-García, J. L. Bórquez-Gastelum y A. Aragón-Martínez. 2009. Los β -agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos: una revisión. *Ciencia, Ergosum.* 1: 6- 3.
- Elam, N. A., J. T. Vasconcelos, G. Hilton, D. L. Van-Overbeke, T. E. Lawrence, T. H. Montgomery, W. T. Nichols, M. N. Streeter, J. P. Hutcheson, D. A. Yates y M. L. Galyean. 2009. Effect of zilpaterol hydrochloride duration of feeding on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 87:2133–2141.
- Engels, F. M. 1989. Some properties of cell wall layers determining ruminant digestion. Applied Science Publishers. 80.
- FINA. 2014. Panorama de la leche y carne de bovino. Financiera Nacional de desarrollo agropecuario, rural, forestal y pesquero. www.FINA.com.mx Consultado 28 Abril 2015.
- FIRA. 2009. Bovino y sus derivados. <http://www.financierarural.gob.mx>, Consultado 20 Septiembre 2013.
- FIRA. 2012. Mercado mundial y cadena de valor de la carne bovina. http://www.academia.edu/3461915/mercado_mundial_y_cadena_de_valor_de_la_carne_bovina. Consultado 28 Septiembre 2013.
- Gásque-Gómez, R. 2008. Enciclopedia bovina. Capítulo 11 glándula mamaria y secreción láctea. www.fmvz.unam.mx. Consultado 28 Abril 2015.
- Genicot, B., D. L. Votion, R. Close, J. K. Lindsey y P. Lekeux. 1995. Ability of broncholidator to prevent bovine experimental respiratory distress. *Vet. Res.* 26:276-283.
- González, P. E. 2011. Marco de referencia, estrategias y líneas de acción para el desarrollo del sector pecuario nacional. SAGARPA. www.sagarpa.gob.mx. Consultado 24 Mayo 2015.
- González-Ríos, H., D. A. Gil y A. Berrondo. 2013. Ferulic acid as feed supplement in beef cattle to promote animal growth and improve the meat quality of the carcass and the meat. U.S. patent published in February 14, 2013, with number US20130041036A1. www.faqs.org/patents/app/20130041036. Consultado 2 Mayo 2014.



- Gorewit, R. C. 1983. Pituitary and thyroid hormone responses of heifers after ferulic acid administration. *J. Dairy Sci.* 66:624–629.
- Gorniak, T., L. Hüther, U. Meyer, P. Lebzien, G. Breves, K. Südekum y S. Dänicke. 2014. Digestibility, ruminal fermentation, ingesta kinetics and nitrogen utilization in dairy cows fed diets based on silage of a brown midrib or a standard maize hybrid. *Animal Nutrition.* 68:143-158.
- Hatfield, D. R., J. Ralph y J. H. Grabber. 1999. Review cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.* 79:403–407.
- Herrera, R., M. L. Alejo, y A. J. Asaff. 2011. Methods to accelerate muscle development, decrease fat deposits, and enhance feeding efficiency in pigs. U.S. patent published in February 24, 2011, with number 20110046224. www.faqs.org/patents/app/20110046224 Consultado 7 Mayo 2014.
- Kikuzaki, H., M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama y H. Taniguchi. 2002. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2161–2168.
- Knot, M., A. Kohler y H. Kauss. 1991. Biosynthesis of ferulic acid esters of plants cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *El Sevier Science Publisher.* 290: 209-212.
- Krause, D. O., S. E. Denman, R. I. Mackie, M. Morrison, A. L. Rae, G. T. Attwood y C. S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:663–693.
- Manach, C.; C. Morand; O. Texier; M. L. Favier; G. Aguiló; C. Demigne; F. Regerat y C. Remesey. 1995. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.* 125: 1911–1922.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, y L. Jiménez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:727–747.
- Montgomery, J. L., C. R. Krehbiel, J. J. Cranston, D. A. Yates, J. P. Hutcheson, W. T. Nichols, M. N. Streeter, R. S. Swingle y T. H. Montgomery. 2009. Effects of dietary zilpaterol hydrochloride on feedlot performance and carcass characteristics of beef steers fed with and without monensin and tylosin. *J. Anim. Sci.* 87:1013-1023.
- Navarro-Ocaña, Gonzalez-Vazquez, Arrieta-Báez y Hernandez-Vazquez. 2009. Estudio de la dimerización y transesterificación del ferulato de etilo, Pag 1, XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.



- Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995. Trato humanitario en la movilización de animales. Publicada en diario oficial de la federación el 23 de Marzo de 1998.
- Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Publicada en diario oficial de la federación el 16 de Julio de 1996.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ZOO-1997, Especificaciones de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Publicada en diario oficial de la federación el 1 de Marzo de 2000.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Publicada en el diario oficial de la federación el 22 de Agosto de 2001.
- Norma Oficial Mexicana NOM-061-1999, Especificaciones de los alimentos para consumo animal. Publicada en el diario oficial de la federación el 11 de Octubre de 2000.
- Ouand, S. y K. Kwok. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric.* 84:1261–1269.
- Owens, F. N. y A. L. Goetsch. 1988. Fermentación ruminal. En: el rumiante, fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church (Ed.). Editorial Acribia, S. A.
- Pagella, J. H. 1998. Urinary benzylated compounds as potential markers of forage intake and metabolism of their precursors in ruminants. Ph D Dissertation, Aberdeen University, UK.
- Platt, J. P., M. J. Anderson y B. J. Johnson. 2013. The effect of ferulic acid on myogenic regulators of growth in bovine satellite cells. Department of Animal and Food Sciences, Texas Tech University, Lubbock, TX 79409.
- Rosenthal, I., B. Rosen y S. Bernstein. 1997. Phenols in milk evaluation of ferulic acid and other phenols as antifungal agents. *Milchwissenschaft*, 52: 134–138.
- Rubio, L. S. M., D. B. Varela y R. D. M. Medina. 2012. Carne de res mexicana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. INIFAP.
- Sanidad Animal. 2015. Sanidad animal/ volumen urinario. Mundo pecuario www.mundopecuario.com. Consultado 28 Abril 2015.



- SAGARPA. 2006. Buenas prácticas pecuarias en el manejo de ganado bovino de carne en confinamiento. 2^{da} Edición. www.senasica.gob.mx. Consultado 28 Septiembre 2013.
- SAS institute. (2006). SAS user's guide: statistics. Cary, NC: SAS institute.
- Schaller, F., L. Rahalison, N. Islam, O. Potterat, K. Hostettmann, H. Stoeckli-Evans y S. Mavi. 2000. A new potent antifungal quinone methide diterpene with a cassane skeleton from *Bobgunnia madagascariensis*. *Helvetica Chimica*. 83: 407–413.
- SENASICA. 2015. Exportación de becerros y vaquillas en pie, México 2010-2014. www.AMEG.com.mx. Consultado 15 Abril 2015.
- SIAP. 2009. Exportación de ganado bovino en pie a los estados unidos de américa principales estados exportadores. www.siap.com.mx. Consultado 5 Mayo 2015.
- SIAP. 2014. Bovino carne población ganadera 2007 – 2013. www.siap.com.mx. Consultado 5 Mayo 2015.
- Soberon, M. A., D. J. R. Cherney y J. H. Cherney. 2012a. Free ferulic acid uptake in ram lambs. *J. Anim. Sci.* 90:1885- 1891.
- Soberon, M. A., J. H. Cherney, R. H. Liu, D. A. Ross y D. J. R. Cherney. 2012b. Free ferulic acid uptake in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 95: 6563-6570.
- US EPA Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver.3.12. Nov 30, 2004. Available. <http://www.epa.gov>. Consultado 7 junio 2015
- Wheeler T. L. y M. Koohmaraie. 2014. Effects of the β -adrenergic agonist I644, 969 on muscle protein turnover, endogenous proteinase activities, and meat tenderness in steers. *J. Anim. Sci.* 1992. 70:3035- 3043.
- Whetsell, M. S., E. C. Prigge y E. L. Nestor. 2004. Influence of mass of ruminal contents on voluntary intake and digesta passage in steers fed a forage and a concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 2004. 82:1806–1817.
- Yu, P., J. J. McKinnon y D. A. Christensen. 2005. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of a multienzyme cocktail: In vitro studies. *J. Anim. Sci.* 83:1133-1141.