



RAFAEL CAPUTO OLIVEIRA

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM
FINAL DE GESTAÇÃO COM BETACAROTENO**

LAVRAS-MG

2014

RAFAEL CAPUTO OLIVEIRA

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM FINAL DE
GESTAÇÃO COM BETACAROTENO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Marcos Neves Pereira

Coorientadora

Dra. Nadja Gomes Alves

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Oliveira, Rafael Caputo.

Suplementação de vacas leiteiras em final de gestação com
betacaroteno / Rafael Caputo Oliveira. – Lavras : UFLA, 2014.

134 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. Placenta. 2. Provitamina A. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 636.208528

RAFAEL CAPUTO OLIVEIRA

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM FINAL DE
GESTAÇÃO COM BETACAROTENO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2014.

Dr. Antônio Gilberto Bertechini	UFLA
Dr. Gustavo Augusto de Andrade	UFLA
Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira	EPAMIG/URES

Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

LAVRAS – MG

2014

RESUMO

A suplementação pré-parto de betacaroteno foi avaliada. O conjunto de dados continha 283 vacas holandesas que receberam um tratamento por mais de 14 dias ($29,1 \pm 6,9$ d). As vacas foram blocadas em pares por paridade e data prevista do parto e atribuídas aleatoriamente a um dos tratamentos: Betacaroteno (1,2 g/vaca/d. Rovimix, DSM) ou controle. O mesmo lote da TMR foi oferecido a todas as vacas. O suplemento foi adicionado por cima da dieta e completamente misturado uma vez ao dia. A produção de leite foi registrada diariamente e amostrada aos $30,1 \pm 8,3$ dias pós-parto. As distribuições de frequência foram analisadas com o GENMOD do SAS por meio de regressão logística para dados binomiais. As variáveis contínuas foram analisadas com o MIXED. Dentro de paridade, as estimativas não paramétricas da função de sobrevivência para as variáveis reprodutivas foram computadas usando o método do produto-limite de Kaplan-Meier com o LIFETEST. O teor sanguíneo de betacaroteno no início do experimento foi similar ($2,99 \mu\text{g/mL}$, $P=0,59$) e atingiu um pico a $3,26 \mu\text{g/mL}$ no dia -15 pré-parto para vacas suplementadas ($2,62 \mu\text{g/mL}$ para o controle, $P<0,01$). A densidade do colostro, a produção de leite e o teor de sólidos do leite foram semelhantes ($P>0,32$). A produção de leite a partir do dia 20 ao 109 da lactação foi 3105 kg para primíparas e de 3.595 kg para multíparas ($P<0,01$). O Betacaroteno tendeu a aumentar o teor de proteína do leite de 2,90 para 2,96% ($P=0,09$) e para diminuir a proporção de primíparas com a relação gordura sobre proteína do leite $>1,5$, 25,8 para 9,7% ($P=0,10$). A proporção de primíparas com parto difícil, $\text{CCS}>200.000$ células/mL, metrite, progesterona >1 ng/mL em 21 e 42 d, % concepção ao primeiro serviço e % prenhez a 90 e 150 d foram semelhantes ($P>0,46$). Houve tendência de diminuição da incidência de $\text{CCS}>200.000$ células/mL em multíparas suplementadas com betacaroteno (38,9% vs. 28,1%, $P=0,12$), outras variáveis foram semelhantes ($P>0,21$). O Betacaroteno reduziu a proporção de multíparas com retenção de placenta 12h pós-parto de 29,9% para 21,7%, o tempo de liberação de placenta foi 392 min (340-440) para o Betacaroteno e 490 min (395-540) para o Controle (Mediana e intervalo de confiança de 95%. Logrank $P=0,05$ e Wilcoxon $P=0,04$). O Betacaroteno em primíparas não determinou a liberação da placenta (incidência foi 15,4%). Respostas nos intervalos do parto ao primeiro estro, ao primeiro serviço e à concepção não foram detectadas. A suplementação pré-parto de betacaroteno aumentou o teor sanguíneo em torno do parto. Não houve resposta detectável na produção de leite ou desempenho reprodutivo. O Betacaroteno reduziu a incidência de retenção de placenta em vacas multíparas.

Palavras-chave: Betacaroteno. Período de transição. Retenção de placenta.

ABSTRACT

The pre-calving supplementation of beta-carotene was evaluated. The data set contained 283 Holsteins that received a treatment for >14 d (29.1 ± 6.9 d). Cows were paired blocked by parity and expected calving date and assigned to a treatment: Beta-carotene (1.2 g/cow/d. Rovimix, DSM) or Control. The same TMR batch was offered to all cows and beta-carotene was top dressed per cow once a day. Milk yield was recorded daily and sampled at 30.1 ± 8.3 d post-calving. Frequency distributions were analyzed with GENMOD of SAS using logistic regression for binomial data. Continuous variables were analyzed with MIXED. Within parity, nonparametric estimates of the survivor function for reproductive variables were computed using the product-limit method of the Kaplan-Meier method with LIFETEST. Blood beta-carotene content at the start of the experiment was similar ($2.99 \mu\text{g/mL}$, $P=0.59$) and peaked at $3.26 \mu\text{g/mL}$ on day -15 pre-calving for supplemented cows ($2.62 \mu\text{g/mL}$ for Control, $P<0.01$). Colostrum density, milk yield, and milk solids content were similar ($P>0.32$). Milk yield from d 20 to 109 of lactation was 3105 kg for primiparous and 3595 kg for multiparous ($P<0.01$). Beta-carotene tended to increase milk protein content from 2.90 to 2.96% ($P=0.09$) and to decrease the proportion of primiparous with a milk fat to protein ratio >1.5 from 25.8 to 9.7% ($P=0.10$). The proportion of primiparous with difficult calving, SCC >200,000 cells/mL, metritis, progesterone >1 ng/mL at 21 and 42 d, % conception at first service, and % pregnant at 90 and 150 d were similar ($P>0.46$). There was a trend for decreased incidence of SCC >200,000 cells/mL in multiparous supplemented with beta-carotene (38.9% vs. 28.1%, $P=0.12$), other variables were similar ($P>0.21$). Beta-carotene reduced the proportion of multiparous with retained placenta 12 h post-calving from 29.9% to 21.7%, time of placenta release was 392 min (340 to 440) for beta-carotene and 490 min (395 to 540) for Control (Median and 95% confidence interval. LogRank $P=0.05$ and Wilcoxon $P=0.04$). For primiparous, beta-carotene did not determine placenta release (incidence was 15.4%). Responses in the intervals from calving to first estrous, to first service, and to conception were not detected. The pre-calving supplementation of beta-carotene increased the blood content around calving. There was no detectable response in milk yield or reproductive performance. Beta-carotene reduced the incidence of retained placenta in multiparous cows.

Keywords: Beta-carotene. Retained placenta. Transition period.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Estrutura da unidade isoprenoide e de alguns carotenoides encontrados nos alimentos..... 17
- Figura 2 Bioconversão do betacaroteno a retinol.....32
- Figura 3 Interação entre os antioxidantes alfatocoferol (TOH), carotenos (CAR) e ácido ascórbico (ASCH) e com as espécies reativas de oxigênio (ERO).....48

ARTIGO 1

- Figure 1 Survival curve for time post-calving of placenta release for multiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 392min (340 to 440) for Beta-carotene and 490min (395 to 540) for Control. LogRank $P=0.05$ and Wilcoxon $P=0.04$132
- Figure 2 Survival curve for time post-calving of placenta release for primiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 388min (285 to 440) for Beta-carotene and 375min (290 to 425) for Control. LogRank $P=0.87$ and Wilcoxon $P=0.86$133
- Figure 3 Survival curve for calving to 1st estrous for multiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 38d (34 to 43) for Beta-carotene and 44d (37 to 50) for Control. LogRank $P=0.55$ and Wilcoxon $P=0.23$134
- Figure 4 Survival curve for calving to 1st estrous for primiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 39d (33 to 51) for Beta-carotene and 34d (30 to 43) for Control. LogRank $P=0.34$ and Wilcoxon $P=0.42$135
- Figure 5 Survival curve for calving to conception for multiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). LogRank $P=0.82$ and Wilcoxon $P=0.75$136
- Figure 6 Survival curve for calving to conception for primiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median was 125d for Beta-carotene and 97d for Control. LogRank $P=0.77$ and Wilcoxon $P=0.65$137

- Figure 7 Survival curve for calving to 1st service for multiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 70d (65 to 79) for Beta-carotene and 64d (61 to 70) for Control. LogRank $P=0.09$ and Wilcoxon $P=0.07$138
- Figure 8 Survival curve for calving to 1st service for primiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 65d (56 to 69) for Beta-carotene and 61d (57 to 67) for Control. LogRank $P=0.73$ and Wilcoxon $P=0.87$139

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

- Tabela 1 Efeito da suplementação pós-parto de betacaroteno no teor plasmático e no desempenho produtivo, reprodutivo e de saúde em vacas leiteiras.....
Erro! Indicador não definido.
- Tabela 2 Efeito da suplementação pré e pós-parto de betacaroteno no teor plasmático e no desempenho produtivo, reprodutivo e de saúde em vacas leiteiras.....**Erro!**
Indicador não definido.
- Tabela 3 Efeito da suplementação pré-parto de betacaroteno no teor plasmático e no desempenho produtivo, reprodutivo e de saúde em vacas leiteiras..... 78

ARTIGO

- Table 1 Number of observations used for analysis of response variables on treatments Control and Beta-carotene, for primiparous (Prim) and multiparous (Mult) cows.....125
- Table 2 Proportion of cows with blood beta-carotene content High (≥ 3.5 $\mu\text{g/mL}$), Intermediate (≥ 2 to < 3.5 $\mu\text{g/mL}$) or Low (< 2 $\mu\text{g/mL}$) at Days 0 and -15 pre-calving, and at Days 7 and 56 post-calving, on treatments Control or Beta-carotene.....126
- Table 3 Blood beta-carotene content ($\mu\text{g/mL}$) at Days 0 and -15 pre-calving, and at Days 7 and 56 post-calving, for primiparous (Prim) and multiparous (Mult) cows on treatments Control or Beta-carotene..... 127
- Table 4 Milk somatic cell score, colostrum density, and milk yield and solids content for primiparous (Prim) and multiparous (Mult) cows on treatments Control or Beta-carotene.....128
- Table 5 Proportion of health and reproductive events for primiparous cows on treatments Control or Beta-carotene.....129
- Table 6 Proportion of health and reproductive events for multiparous cows on treatments Control or Beta-carotene.....130
- Table 7 Blood beta-carotene content ($\mu\text{g/mL}$) at 7 and 56 days post-calving according to events.....131

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 13
2	REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1	Betacaroteno e outros carotenoides 15
2.2	Estrutura química dos carotenoides nos alimentos 16
2.3	Produção industrial e algumas formas comerciais de betacaroteno 18
2.4	Conteúdo de betacaroteno e outros carotenoides nos alimentos 19
2.5	Metabolismo dos carotenoides 21
2.5.1	Metabolismo ruminal de carotenoides 21
2.5.2	Absorção intestinal de carotenoides 26
2.5.3	Bioconversão de betacaroteno a retinol 31
2.6	Transporte de carotenoides no corpo 34
2.7	Concentração de carotenoides nos tecidos 35
2.8	Estresse oxidativo e as espécies reativas de oxigênio 40
2.9	Comportamento e mecanismos de atuação do betacaroteno como um antioxidante 42
2.9.1	Supressão física do oxigênio singlete 43
2.9.2	Reação dos carotenoides com os radicais livres 43
2.9.3	Interação com outros antioxidantes 47
2.10	Relação da suplementação de antioxidantes com o estado oxidativo de vacas leiteiras no pré-parto 48
2.11	Estado metabólico, oxidativo e função imune de vacas leiteiras no periparto 50
2.12	Ação do betacaroteno na resposta imune afetando a saúde 54
2.12.1	Estudos <i>in vitro</i> 54
2.12.2	Ação na glândula mamária 56
2.12.3	Ação no útero 58
2.12.4	Ação no balanço energético 60
2.12.5	Ação em tumores 61
2.12.6	Mecanismos de atuação 61
2.13	Ação do betacaroteno na produção de leite 62
2.14	Ação do betacaroteno na reprodução 63
2.14.1	Atividade esteroidogênica 63
2.14.2	Efeito da suplementação de betacaroteno no útero e na produção de embriões 65
2.14.3	Suplementação de vacas em lactação com betacaroteno 67

2.14.4	Suplementação de betacaroteno no pré-parto de vacas leiteiras.....	71
2.14.5	Mecanismos de atuação.....	74
2.15	Discussão comparativa entre os principais trabalhos da literatura.....	74
	REFERÊNCIAS.....	80
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	104
	ARTIGO SUPPLEMENTATION OF LATE GESTATION DAIRY COWS WITH BETA-CAROTENE	105

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Em sistemas de produção de leite sob confinamento não é incomum a utilização de dietas baseadas em forragens conservadas e alta inclusão de alimentos concentrados. Esta condição geralmente leva a baixa ingestão e/ou absorção de betacaroteno (Provitamina A), podendo ter impacto negativo sobre o desempenho produtivo e reprodutivo e a saúde de vacas leiteiras.

Respostas benéficas em fertilidade de vacas leiteiras foram obtidas quando betacaroteno foi suplementado após o parto (ARÉCHIGA et al., 1998; DE ONDARZA et al., 2009). Entretanto, ausência de resposta à suplementação (AKORDOR et al., 1986; BINDAS et al., 1984), ou resposta negativa em desempenho reprodutivo (FOLMAN et al., 1987), têm sido também relatadas. A resposta à suplementação com betacaroteno pode ser determinada pela duração do período de suplementação, pelo teor de betacaroteno na dieta basal e pelo teor sanguíneo obtido. O desafio ambiental também determina a resposta do animal ao betacaroteno suplementar (ARÉCHIGA et al., 1998).

O mecanismo de ação pelo qual a suplementação com betacaroteno pode determinar a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras parece envolver sua conversão em vitamina A no útero e ovários (CHEW et al., 1982a; SCHWEIGERT et al., 2001). A vitamina A está relacionada com a implantação e o desenvolvimento embrionário (CLAGETT-DAME; DELUCA, 2002) e também está envolvida na expressão gênica de enzimas relacionadas a esteroidogênese nos ovários (WICKENHEISSER et al., 2005). O betacaroteno também pode ter ação antioxidante, protegendo componentes celulares de espécies reativas de oxigênio (YOUNG et al., 1985). O sistema de defesa antioxidante pode estar sobrecarregado no período próximo ao parto, o que pode ser fator predisponente à ocorrência de enfermidades ligadas ao sistema imune, como retenção de placenta, metrite e mastite (BERNABUCCI et al., 2002,

CASTILLO et al., 2005, LEBLANC et al., 2004). A suplementação com betacaroteno aumentou a resposta proliferativa de linfócitos e melhorou a capacidade fagocítica de neutrófilos polimorfonucleares (MICHAL et al., 1994; TJOELKER et al., 1988).

Aumentos na produção de leite (ARÉCHIGA et al., 1998) e na produção de gordura no leite (DE ONDARZA et al., 2009) foram observados ao suplementar vacas leiteiras com betacaroteno após o parto. O aumento da secreção de gordura no leite pode ser explicado pelo aumento no crescimento de bactérias ruminais celulolíticas ao incubar fluido ruminal com betacaroteno (HINO et al., 1993). Outros autores não observaram efeito na produção e composição de leite em resposta à suplementação de betacaroteno em vacas leiteiras (BINDAS et al., 1984; KAEWLAMUN et al., 2012; RAKES et al., 1985; WANG; OWEN; LARSON, 1988).

No Brasil não é incomum a produção de leite em confinamentos de pequena escala. Neste tipo de sistema de produção de leite é operacionalmente difícil a adoção de dietas específicas para o período imediatamente posterior ao parto, devido ao pequeno número de animais neste estágio da lactação. Entretanto, estratégias nutricionais para o período imediatamente anterior ao parto são normalmente adotadas, viabilizando o uso de suplementos nesta fase do ciclo lactacional. Kaewlamun et al. (2012) e Wang et al. (2013) relataram ganho em saúde uterina de vacas suplementadas com betacaroteno antes do parto. Além disso, Kawashima et al. (2009) demonstraram que vacas leiteiras com teor mais alto de betacaroteno plasmático antes do parto tiveram menor intervalo entre o parto e o primeiro cio, sugerindo que a suplementação com betacaroteno antes do parto pode ter efeito positivo sobre eventos reprodutivos no início da lactação. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta em desempenho produtivo e reprodutivo e a sanidade de vacas leiteiras em início de lactação à suplementação com betacaroteno antes do parto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Betacaroteno e outros carotenoides

O betacaroteno é um dentre mais de 600 carotenoides sintetizados por todos os organismos fotossintéticos incluindo plantas, algas e cianobactérias e também por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. Os carotenoides são encontrados tanto em plantas quanto em animais, porém esses últimos são incapazes de sintetizá-los.

Betacaroteno, xantofila e licopeno são responsáveis, respectivamente, pelas colorações laranja, amarelo e vermelho nos organismos e representam o principal grupo de pigmentos naturais. Em vegetais, a síntese de carotenoides nos tecidos fotossintéticos ocorre nos cloroplastos, onde estão principalmente sob a forma de um complexo carotenoide-proteína (cromoproteínas). Nos tecidos não-fotossintéticos, os carotenoides são depositados nos cromoplastos na forma estrutural atômica cristalina, como nos tomates e cenouras, ou como gotículas de óleo como na manga e pimentão (BRITTON, 1983; KURZ, CARLE; SCHIEBER, 2008).

O betacaroteno é um pigmento lipossolúvel de cor variada encontrado principalmente em plantas (MCDOWELL, 2012). É um precursor indireto de retinol (Vitamina A), o qual não é encontrado nos vegetais, sendo, assim, de grande importância nutricional para herbívoros. Outros carotenoides podem ser convertidos em vitamina A pelos animais, mas a eficiência de conversão é inferior a do betacaroteno (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001).

As folhas de plantas contêm de cinco a dez vezes mais carotenoides que os colmos, sendo que o teor nas forragens depende da síntese e da degradação do composto (LIVINGSTON et al., 1968b; MORRISON, 1917). Park et al. (1983) demonstraram que a fertilização com nitrogênio aumentou a concentração de

carotenoides em forragens; uma possível explicação seria por ativação da biossíntese dos carotenoides por proteínas. A degradação dos carotenoides é promovida por vários fatores, como radiação ultravioleta da luz solar, oxigênio atmosférico (oxidação) ou enzimas (lipoxidases), que se tornam ativas pela decomposição das plantas (MCDOWELL, 2012). Em forragens colhidas e armazenadas (silagens e fenos) a concentração de betacaroteno diminui rapidamente (BRUHN; OLIVER, 1978; PARK et al., 1983), sendo que há também correlação negativa entre a concentração de betacaroteno e o tempo que a forragem é estocada (BRUHN; OLIVER, 1978). Nos períodos chuvosos, a concentração de betacaroteno nas pastagens aumenta, devido a maior presença de brotos, e a concentração diminui com o avançar da maturidade da planta (PARK et al., 1983).

2.2 Estrutura química dos carotenoides nos alimentos

Os carotenoides apresentam a estrutura básica de tetraterpenos formados por oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica com a ordem invertida no centro e apresenta sistema de duplas ligações alternadas entre os átomos de carbono (cadeia poliênica). O sistema de duplas ligações conjugadas confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (MCDOWELL, 2012).

Nas forragens, o todo-trans betacaroteno é o principal representante do grupo dos carotenos, moléculas compostas apenas de hidrogênio e carbono. Carotenos são diferentes das xantofilas que contêm oxigênio na molécula, representadas principalmente pela luteína, zeaxantina e epiluteína (NOZIÈRE et al., 2006). A fórmula química do betacaroteno é $C_{40}H_{56}$. Foram encontrados os isômeros 9-cis e o 13-cis betacaroteno, e o alfacaroteno em algumas forragens,

porém em baixas quantidades (REYNOSO et al., 2004). O alfacaroteno é o isômero primário do betacaroteno que se difere dele pela posição da dupla ligação do anel benzênico terminal. A fórmula estrutural da unidade isoprenoide e de alguns carotenoides estão representadas na figura 1.

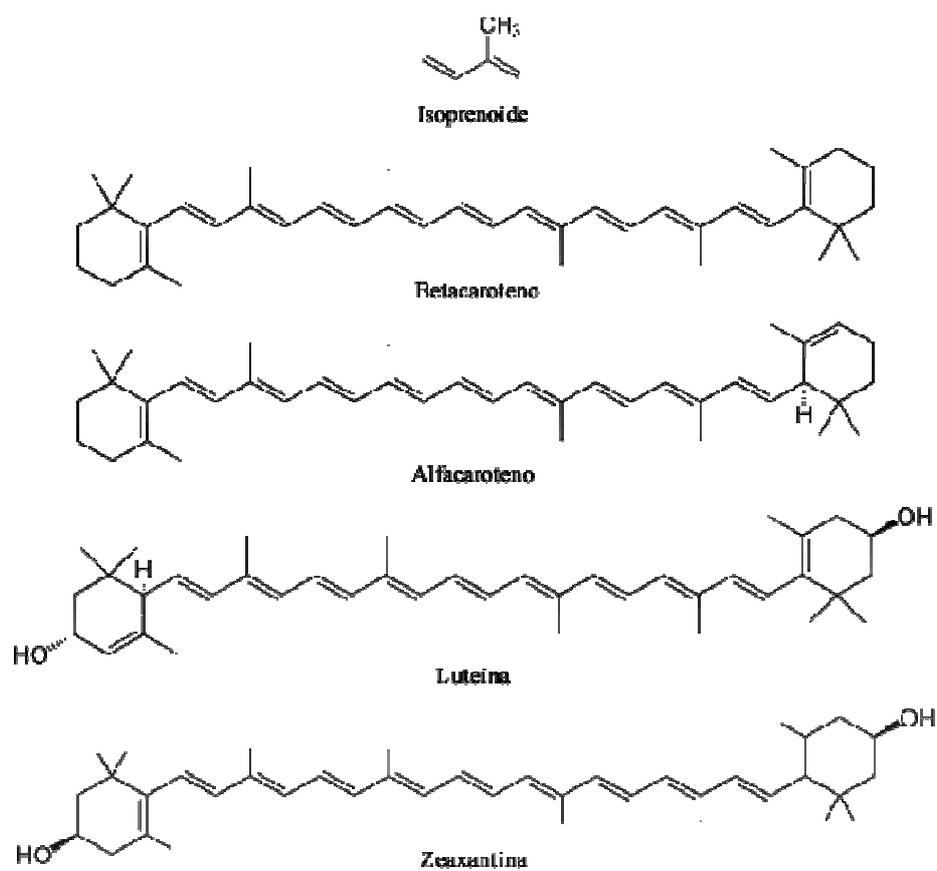


Figura 1 Estrutura da unidade isoprenoide e de alguns carotenoides encontrados nos alimentos.

2.3 Produção industrial e algumas formas comerciais de betacaroteno

A produção industrial de betacaroteno começou em 1954 pela empresa Hoffman-La Roche & Co. Ltd. Atualmente, os dois principais produtores industriais, BASF e Hoffmann-La Roche (a divisão de vitamina foi vendida para a empresa DSM em 2003), também produzem outros carotenoides, como a cantaxantina, a astaxantina, a luteína, os apocarotenoides e a citranaxantina (VALDUGA et al., 2009).

A síntese industrial produz moléculas puras de betacaroteno em estruturas cristalinas. A empresa BASF produz o betacaroteno a partir da reação de uma molécula retinal com uma molécula de betaretiniltrifenilfosfônio (C20 + C20), enquanto que a empresa Hoffmann-La Roche, sintetiza betacaroteno a partir de duas moléculas de C19-aldeído com uma molécula de diol (C19 + C2 + C19) (COUTATE, 1996). Abaixo são citadas algumas fontes comerciais de betacaroteno.

a) Rovimix BetaCarotene 10%, *DSM Nutritional Products Ltd*, Heerlen, Holanda. Consiste em grânulos finamente moídos de fluxo livre e de coloração vermelho acastanhado a castanho avermelhado. Contém no mínimo 10% de betacaroteno (C₄₀H₅₆) finamente disperso em matriz de gelatina e carboidratos revestidos por amido de milho. Produto em pó (pelo menos 95% < peneira No. 20, padrão americano).

b) Lucarotin 10% Feed, *BASF The Chemical Company*, Ludwigshafen, Alemanha. Contém no mínimo 10% de betacaroteno disperso em matriz de gelatina (mono e polissacarídeos). Produto em pó (pelo menos 95% < 0,63mm).

c) Carofertin, *Alvetra&Werfft AG*, Neufeld an der Leitha, Áustria. Solução aquosa injetável de betacaroteno (10 mg/mL) para bovinos e suínos. Administração intramuscular ou subcutânea.

d) OxC-beta, *Avivagen*, Ottawa, Canadá. O produto para animais de produção ainda está em desenvolvimento. O princípio ativo OxC-beta consiste de derivados oxidados (monômeros e polímeros) resultante da oxidação completa do betacaroteno em solução de benzeno e na presença de oxigênio. Apresenta coloração amarelada e fórmula química $C_{40}H_{60}O_{15}$.

2.4 Conteúdo de betacaroteno e outros carotenoides nos alimentos

Assume-se que a concentração ótima de carotenoides na matéria seca de forragens para ruminantes é de 200 ppm (MCDOWELL, 1989). As forragens cultivadas apresentam quatro principais carotenoides: luteína, zeaxantina, epiluteína, e o betacaroteno (NOZIÈRE et al., 2006).

A variação no teor de carotenoides entre espécies forrageiras é menos importante que a variação dentro das espécies devido ao efeito negativo da maturidade da planta sobre o teor do composto. Entre espécies, Chauveau-Duriot et al. (2005) estudaram a variação dos teores de carotenoides das forragens azevém, trevo vermelho e grama pé de galinha, e observaram baixa variação nos teores dos carotenoides na matéria seca destas forragens: $392 \pm 56,5$ ppm para carotenoides totais, $209 \pm 24,4$ ppm para luteína, $88 \pm 11,1$ ppm para betacaroteno, $71 \pm 19,1$ ppm para zeaxantina, $22 \pm 3,9$ ppm para epiluteína. As xantofilas representaram a maior parte dos carotenoides nestas forragens (88%).

Em forrageiras tropicais, Reynoso et al. (2004) não detectaram diferença no teor de betacaroteno e luteína entre grama Bermuda (*Cynodon dactylon*) e capim Pangola (*Digitaria decumbens*). McDowall e McGillivray (1963) demonstraram que a concentração de carotenoides em Azevém foi mais determinada pelo estágio de maturação da planta do que pelas estações do ano. Alguns autores posteriormente confirmaram esta observação (LIVINGSTON et al., 1968b; PARK et al., 1983), parcialmente explicada pela diminuição da

relação entre folhas e caules com o avançar da maturidade da planta (PARK et al., 1983). Marcin e Nad (2012) avaliaram a variação no teor de betacaroteno em alfafa (*Medicago sativa*) após o primeiro corte. Houve queda acentuada no teor de betacaroteno na matéria seca da planta do dia 1 ao dia 10, que foram, respectivamente, 205 ± 16 ppm e 85 ± 12 ppm após o corte, e estabilização do teor do dia 17 ao dia 23, que foram 55 ± 3 ppm e 54 ± 5 ppm.

Silagens de milho apresentam baixo teor de carotenoides. Hegsted et al. (1938) relataram teor na matéria seca da silagem variando de 47 a 134 ppm para carotenoides totais e para a planta recém colhida de 238 ppm. Nozière et al. (2006), em três amostras de silagem de milho, encontraram valores de 70, 76 e 80 ppm de carotenoides totais e concentração de betacaroteno de 24, 30 e 35 ppm. Frye, Williams e Graham (1991) encontraram teor variando de 4 a 56 ppm de carotenos.

Chauveau-Duriot et al. (2005) estudaram o impacto do método de conservação de forragens sobre o teor de carotenoides em azevém, trevo vermelho e grama pé de galinha. O teor de carotenoides totais na matéria seca destas plantas foi $392 \pm 56,5$. A fenação induziu queda média de 78,9 % no teor de carotenoides totais das forragens.

A queda no teor de carotenoides é maior em silagem com pH mais alto, em condições de baixa anaerobiose induzida por atraso no fechamento do silo e em maior tempo de armazenamento da silagem (KALAC; MCDONALD, 1981; KALAC et al., 1983). As perdas podem alcançar 80% da concentração de betacaroteno na forragem colhida (KALAC et al., 1983).

A maioria dos alimentos concentrados tem baixa concentração de carotenoides. Farelo de milho contém principalmente luteína e zeaxantina (13,5 ppm na MS) e pouca quantidade de betacaroteno (<1 ppm na MS) (HOLDEN et al., 1999). O calor utilizado ou gerado no processamento dos concentrados

também é capaz de destruir grande parte dos carotenoides presentes nestes alimentos (HOLDEN et al., 1999; NYS, 2000).

2.5 Metabolismo dos carotenoides

2.5.1 Metabolismo ruminal de carotenoides

Os carotenoides presentes nas forragens estão, principalmente, complexados com proteínas no citoplasma de células vegetais (BRITTON, 1983). O primeiro evento no processo digestivo dos carotenoides é a degradação da parede celular vegetal liberando os carotenoides para a fase líquida da digesta (Mora et al., 1999). Serrano et al. (2005) observaram que a disponibilidade dos carotenoides no intestino de humanos é dependente do teor de lignina e de proteínas não digestíveis nas plantas. Esses dados sugerem que a fonte e a maturação da forragem podem influenciar também na taxa fracional de degradação ruminal de carotenoides.

Mora et al. (1999) utilizaram quatro novilhos canulados no rúmen para determinar a taxa fracional de desaparecimento (kd) *in vitro* e *in situ* de betacaroteno contido em feno de alfafa. Apenas 10% do betacaroteno desapareceram após oito horas de incubação *in vitro* e se mantiveram praticamente estáveis até 64 horas (11,8%). O kd do betacaroteno foi 0,13% h⁻¹. *In situ*, 71,9% do betacaroteno desapareceram nas primeiras oito horas, sendo que o desaparecimento foi 91,3% no final de 64 horas. O kd do betacaroteno foi 2,5 % h⁻¹ e da matéria seca do feno de alfafa foi 1,9% h⁻¹. Os autores concluíram que essas diferenças entre as técnicas *in vitro* e *in situ* foram devidas à taxa fracional de desaparecimento da matéria seca do feno de alfafa, ou seja, grande parte dos betacarotenos presentes na célula vegetal são liberados no rúmen e chegam ao intestino sem sofrer degradação ruminal.

Cruz-Monterrosa et al. (2011) utilizaram quatro novilhos canulados no rúmen e no duodeno para avaliar a digestão de carotenoides em grama Estrela Africana (*Cynodon plectostachyus*). Amostras da forragem contendo 697 ppm de carotenoides totais na matéria seca foram incubadas *in situ* por 12, 24, 48 e 72 h. Após a incubação ruminal, parte das amostras foi transferida para sacos de nylon e introduzida no duodeno para determinar o desaparecimento intestinal e no trato digestivo total. No rúmen, mais de 40% da concentração inicial de carotenoides na forragem desapareceram nas primeiras 12 h de incubação, enquanto o desaparecimento foi 57, 63 e 71% do inicial nos tempos 24, 48 e 72 h, respectivamente. Parte do desaparecimento dos carotenoides foi atribuído à atividade biohidrogenadora do rúmen, já que estes compostos apresentam várias insaturações na cadeia carbônica.

Em um estudo *in vitro*, realizado no laboratório do INRA, não foi detectada degradação ruminal de luteína presente em forragens. Entretanto, houve desaparecimento de 50% do inicial quando luteína sintética foi adicionada (NOZIÈRE et al., 2006).

Keating, Hale e Hubbert (1964) incubaram betacaroteno sintético em fluidos ruminais de 12 novilhos alimentados com dietas contendo 30 ou 70% de concentrado. Estes autores relataram que a degradação ruminal de betacaroteno foi 16,6% e 26,3% do inicial após 3,5 e 16 h de incubação ruminal *in vitro*, respectivamente. Não foi detectado efeito da composição da dieta na degradação do betacaroteno. Davison e Seo (1963), em experimento conduzido com fluido ruminal de novilhas *in vitro*, observaram que a proporção de degradação de betacaroteno em produto purificado foi 25% do inicial após sete horas de incubação.

Baruffaldi et al. (1981) estudaram a influência de oito valores de pH na estabilidade do betacaroteno de cenoura fresca. Os valores de pH estudados foram de 5,0 a 8,0. O teor de betacaroteno manteve-se inalterado para todos os

valores de pH avaliados. Qian et al. (2012) também não detectaram diferenças na degradação do betacaroteno presente em emulsões de óleos enriquecidos com betacaroteno sintético incubados *in vitro*, em pH de 4 a 8, por cinco dias.

Entretanto, foi encontrado efeito negativo na degradação do betacaroteno em pH 3. Os autores também avaliaram o efeito das temperaturas de 5, 20, 37 e 55 °C na degradação do betacaroteno.

Só foi detectada diferença na degradação do betacaroteno entre as temperaturas de 5, 20 e 37 °C, a partir do quarto dia. Porém houve maior degradação, já a partir do primeiro dia, para a temperatura de 55 °C em relação às demais. Estes resultados poderiam ser extrapolados para um possível efeito das dietas acidogênicas na estabilidade ruminal do betacaroteno, já que estes valores de pH podem ser encontrados no ambiente ruminal (GARRETT et al., 1999) e também para um efeito da temperatura ruminal (~39,5 °C) sobre a degradação do betacaroteno.

Cardinault et al. (2006) avaliaram a digestão de carotenoides em ovinos com cânula ruminal, duodenal e ileal. Os ovinos foram alimentados duas vezes ao dia com Trevo Vermelho (*Trifolium pratense*). A ingestão diária de luteína, epiluteína e betacaroteno foram de 174, 52 e 37 mg, respectivamente.

O fluxo diário de carotenoides no duodeno foi superior ao ingerido (204, 56 e 117 mg para luteína, epiluteína e betacaroteno, respectivamente). Estes resultados demonstram que além da degradação ruminal, ocorre produção de carotenoides no rúmen. Este resultado foi coerente aos obtidos *in vitro* pelos mesmos pesquisadores (CARDINAULT et al., 2004).

McGillivray (1951) demonstrou que pode ocorrer síntese de carotenoides pelos microrganismos ruminais e intestinais. Neste trabalho foi mensurada a concentração de carotenoides totais e lignina no alimento, nas fezes e em diversos pontos do trato gastrointestinal de ovelhas sacrificadas. A lignina

foi utilizada como valor de referência. Houve aumento na relação carotenoides/lignina após a passagem pelo rúmen e também após o ceco.

Vários microrganismos têm sido utilizados na bioprodução de carotenoides, sendo as leveduras do gênero *Rhodotorula* consideradas com alto potencial industrial (MALDONADE, 2003). Algumas espécies da levedura *Rhodotorula* já foram isoladas no rúmen de vacas, como a *R. glutinis* (CLARKE; DI MENNA, 1961).

Maldonade (2003), estudando a produção de carotenoides por leveduras cultivadas *in vitro*, verificou que, para algumas espécies, o extrato de levedura foi o substrato com maior influência na produção de carotenoides, enquanto que os sais de sulfato e fosfato tiveram efeito negativo. Para a espécie *R. glutinis*, a máxima concentração de carotenoides obtida foi alcançada com 4 g/L de extrato de levedura e 17 g/L de glicose em pH inicial 4,0.

Yan et al. (2007) avaliaram o efeito do betacaroteno sobre a fermentação ruminal *in vitro*. O fluido ruminal foi obtido de 3 cabras alimentadas com feno de gramínea, farelo de soja, quirera de arroz e minerais. Estes alimentos foram incubados com fluido ruminal por 0, 1, 3, 5, 8, 12 e 24 h. Diferentes teores de betacaroteno (Betacarotene 10%, Roche Vitamins, Basel, Suíça) foram avaliados: 0, 10, 50, 100, 200, 500 mg/L de fluido ruminal. O teor de nitrogênio amoniacal no fluido ruminal nos tempos 3 a 24 h foi menor nos tubos contendo betacaroteno. A concentração de proteína microbiana no fluido em 24 h de incubação aumentou com o aumento no teor de betacaroteno. A concentração de ácido acético após 24 h de incubação foi aumentada pela adição de betacaroteno, e não houve diferença no teor de propionato e de ácidos graxos totais no fluido.

Os autores concluíram que houve aumento no crescimento de bactérias celulolíticas estimulado pelo betacaroteno.

Hino et al. (1993) detectaram efeito positivo sobre o crescimento bacteriano e a digestão da fibra ao adicionar betacaroteno e/ou alfatocoferol

(Vitamina E) ao fluido ruminal de cabras *in vitro*. Os fluidos ruminais foram incubados na presença ou não de betacaroteno (5 ou 10 mg/L) e/ou alfatocoferol (5 mg/L), com solução de glicose (1 g/L) e diferentes concentrações de óleo de girassol.

Houve aumento no crescimento bacteriano até 100 mg/L de óleo de girassol, sendo que o crescimento foi maior para o tratamento com alto teor de betacaroteno (10 mg/L).

Em concentrações de óleo de girassol superiores a 100 mg/L houve queda no crescimento bacteriano, demonstrando o efeito tóxico dos ácidos graxos insaturados sobre as bactérias ruminais. Entretanto, em todos os teores de óleo de girassol, a inclusão de betacaroteno (10 mg/L) aumentou o teor de N-bacteriano no fluido ruminal.

A associação de betacaroteno (5 mg/L) com alfatocoferol (5 mg/L) melhorou a digestibilidade de fibra quando 1 g/L de pó de celulose foi acrescido aos tubos em substituição à glicose. Da mesma forma, 100 mg/L de óleo de girassol estimularam a digestão da fibra (17% de aumento), sendo que na presença dos dois antioxidantes (5 mg/L de cada), a digestibilidade aumentou ainda mais (33% de aumento) comparad ao controle (sem antioxidantes e sem óleo de girassol). Ensaio com 300 mg/L de óleo de girassol diminuíram em 72% a digestibilidade da fibra, porém não houve queda na digestão fibrosa quando antioxidantes foram associados ao óleo de girassol. Os autores sugerem que antioxidantes poderiam suprimir radicais livres (peróxidos) formados pela peroxidação de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, mecanismo pelo qual gordura insaturada seria tóxica às bactérias ruminais.

Como conclusão, os principais dados que demonstraram alta degradação ruminal de carotenoides foram realizados com carotenoides sintéticos. Enquanto que para os carotenoides contidos nas forragens, a degradação *in vitro* foi baixa ou não houve.

A degradação é atribuída aos microrganismos, mas pode haver um consumo de carotenoides pelas reações com os radicais livres no rúmen. Provavelmente, a composição da dieta, o pH e a temperatura ruminal não afetam a degradação dos carotenoides no rúmen. Há indícios de síntese ruminal de carotenoides.

Entretanto, mais estudos seriam necessários para confirmar estes dados. De qualquer forma, mesmo com essa suposta produção ruminal de carotenoides, vacas leiteiras alimentadas com dietas baseadas em forragens conservadas não conseguem manter, em nível ótimo, o teor plasmático de betacaroteno (HERDT; SEYMOUR, 2003). Outros dados indicam, ainda, que o betacaroteno influencia alguns parâmetros fermentativos no rúmen, diminuindo o N-amoniaco e aumentando a digestão da fibra, o acetato e o N-bacteriano, sugerindo crescimento de bactérias celulolíticas.

2.5.2 Absorção intestinal de carotenoides

A absorção dos carotenoides ocorre na mucosa do jejuno proximal (MCDOWELL, 2012). Serrano et al. (2005) demonstraram que há muitos fatores que podem influenciar a liberação dos carotenoides do alimento no intestino de humanos. Os carotenoides estão normalmente complexados com proteínas nos cloroplastos (principalmente nas folhas) e/ou em sua forma estrutural cristalina nos cromoplastos (frutos e flores) e necessitam ser transferidos para a fase lipídica da digesta (micelas) para serem absorvidos. Neste estudo, houve forte correlação negativa entre a disponibilidade intestinal de carotenoides contidos em vegetais de folhas verdes e o conteúdo de lignina e proteínas não digestíveis ($r = -0,99$ e $-0,98$, respectivamente).

O processo absorptivo dos carotenoides é semelhante ao dos lipídeos, já que carotenoides são pigmentos lipossolúveis (FURR; CLARK, 1997). No

entanto, há distinção entre alguns carotenoides em relação à eficiência absorptiva no trato digestivo. Xantofilas (moléculas polares) estão localizadas na superfície das emulsões e, conseqüentemente, a eficiência da sua transferência da emulsão para as micelas é mais elevada (25-40%) do que para os carotenos (12-18%) que são moléculas menos polares, ficando integradas no centro destas partículas, podendo ter influência na eficiência absorptiva (FURR; CLARK, 1997).

Moore, Gugger e Erdman (1995) utilizaram células da mucosa do intestino delgado de roedores (*Mongolian gerbils*) para estudar o processo absorptivo dos carotenoides. Foi detectada absorção linear até a concentração máxima de 5,9 $\mu\text{mol/L}$, sugerindo captação passiva entre as concentrações utilizadas.

Entretanto, During et al. (2002), utilizando concentrações maiores de carotenoides que em Moore, Gugger e Erdman (1995), apesar de observarem absorção linear até 6 $\mu\text{mol/L}$, detectaram estabilização da absorção a partir de 10 $\mu\text{mol/L}$.

A extensão da absorção, *in vitro*, das células CaCo-2 de todo-trans betacaroteno, 9-cis e 13-cis betacaroteno, alfacaroteno, luteína e licopeno até 16h de incubação foi 11, 2, 3, 10, 7 e 2,5%. Houve efeito marcante da interação entre carotenoides na extensão da absorção. Licopeno reduziu a absorção de betacaroteno em 4,7 vezes quando 1 $\mu\text{mol/L}$ de betacaroteno e 5 $\mu\text{mol/L}$ de licopeno foram incubados com células CaCo-2. Betacaroteno também reduziu a absorção de alfacaroteno, porém com $P > 0,05$. Reboul et al. (2005) detectaram uma redução de 30 e 57% na absorção de luteína ao incubar células CaCo-2 *in vitro* com o anticorpo anti-SR-BI e com o inibidor químico BLT1, respectivamente. Sugerindo que pelo menos parte da absorção dos carotenoides é realizada por mediadores de transferência seletiva de lipídeos. Células CaCo-2 são células comerciais que apresentam fenótipo morfológico e funcional semelhante aos enterócitos. A cinética de absorção, a inibição da absorção de um

carotenoide por outro, a especificidade/predileção de absorção entre os isômeros e a importância de alguns mediadores seletivos de lipídeos na absorção dos carotenoides indicam que a captação intestinal dos carotenoides acontece por processo facilitado.

Em ruminantes, a digestibilidade intestinal de carotenoides presentes em diversas forragens variou de 8 a 60% (CARDINAULT et al., 2006; CRUZ-MONTERROSA et al., 2011; NOZIÈRE et al., 2006; YANG; LARSEN; TUME, 1992). Cruz-Monterrosa et al. (2011) demonstraram que amostras de uma gramínea que não foram incubadas no rúmen e que foram colocadas diretamente no duodeno e coletadas nas fezes, tiveram digestibilidade intestinal de carotenoides de 53%. Entretanto, amostras da mesma forragem que foram previamente incubadas no rúmen por 12 h tiveram digestibilidade intestinal de 27%, enquanto que amostras que foram incubadas no rúmen por 24, 48 e 72 h tiveram digestibilidades intestinais de 19, 21 e 22%, respectivamente. Estes dados sugerem que os carotenoides de alta digestibilidade são degradados no fluido ruminal e/ou chegam ao intestino sem sofrer degradação, enquanto que carotenoides que permaneceram no conteúdo celular da forragem estão aparentemente mais protegidos dentro da célula vegetal.

Cardinault et al. (2006) observaram que a digestibilidade aparente no intestino delgado de ovinos foi 15,7% para luteína e de 14,7% para betacaroteno presente em trevo vermelho. Entretanto, a digestibilidade aparente no intestino delgado pode ter sido subestimada em relação a digestibilidade verdadeira, já que parte dos carotenoides no íleo pode ter se originado da circulação entero-hepática e das células de descamação (BOLING et al., 1969).

Fernandez et al. (1976) observaram que a recuperação fecal de betacaroteno em ovelhas não variou após aumentar a infusão abomasal de 1,38 para 6,15 mg de betacaroteno sintético. Além disso, Mora et al. (2001) ao aumentar a suplementação de betacaroteno (Lucarotin 10%. BASF The

Chemical Company, Ludwigshafen, Alemanha) de 5,5 para 352 ppm na MS da dieta de novilhos da raça Holandesa que passaram por período de depleção com dieta isenta de forragens frescas, observaram aumento na digestibilidade aparente no trato digestivo de 66 para 88%. Estes dados contradizem os de (MOORE; GUGGER; ERDMAN, 1995) e de (DURING et al., 2002) que encontraram absorção linear e, após certa concentração, detectaram estabilização em resposta ao aumento da concentração dos carotenoides em cultivo *in vitro*.

Em humanos, os valores de digestibilidade intestinal variaram de 9 a 52% (VAN HET HOF et al., 1999a). A biodisponibilidade relativa de betacaroteno em alguns vegetais variou de 3 a 6% para folhas de espinafre, 19 a 34% para cenouras e 22 a 24% para brócolis, em relação a disponibilidade do betacaroteno purificado (Hoffman-LaRoche) (CASTENMILLER et al., 1999; DE PEE et al., 1995; MICOZZI et al., 1992; VAN HET HOF et al., 1999a). A biodisponibilidade relativa foi medida pela razão da resposta plasmática induzida pelos betacarotenos nos vegetais consumidos pela resposta da suplementação com o betacaroteno sintético. Esses dados sugerem que os carotenoides presentes nos cromoplastos (brócolis e cenoura) se desprendem mais facilmente da célula vegetal, apresentando, assim, maior eficiência de absorção que aqueles presentes nos cloroplastos (espinafre). Além disso, nesses experimentos e principalmente em (DE PEE et al., 1995), foi demonstrada a superioridade dos suplementos sintéticos em alcançar teores plasmáticos satisfatórios de betacaroteno e vitamina A em relação aos vegetais.

A biodisponibilidade relativa da luteína também foi mensurada. Van het Hof et al. (1999b) demonstraram que a biodisponibilidade da luteína foi bem maior que a do betacaroteno em dieta com variedade de verduras (67 e 14%, respectivamente). O mesmo foi encontrado em folhas de espinafre (45 e 5,1%, respectivamente) (CASTENMILLER et al., 1999;).

O teor dietético de lipídeos pode afetar a absorção de carotenoides nos animais. Fernandez et al. (1976) infundiram betacaroteno no abomaso de bovinos e observaram que a absorção foi ao redor de 36% quando estes foram infundidos juntamente com solução de monoacilgliceróis e foi 54% quando infundidos com triacilgliceróis, enquanto a absorção foi apenas 15% quando água foi usada como solvente. Esses dados foram calculados a partir da recuperação fecal de betacaroteno.

Em experimento com bovinos alimentados a pasto, Yang et al. (2002), ao suplementarem 2.500 UI de vitamina E/d, detectaram redução na concentração plasmática e tecidual de betacaroteno. Estes autores sugeriram que houve redução na absorção ou talvez competição entre o tocoferol e o betacaroteno pelo transporte nas lipoproteínas. Entretanto, este fato poderia ser explicado pela relação de proteção da vitamina E pelos carotenoides. Ao reduzir moléculas de tocoferoxil (vitamina E oxidada pelos radicais livres) para tocoferol, os carotenoides são consumidos no processo (BÖHM et al., 1997; MAYNE et al., 1989; PACKER, 1993).

Como conclusão, a eficiência de absorção dos carotenoides dos alimentos no intestino é dependente de suas localizações no tecido vegetal. Os carotenoides presentes nos cromoplastos apresentam maior biodisponibilidade que os presentes nos cloroplastos. Além disso, a eficiência de absorção é maior em alimentos com menores teores de lignina e proteína não digestível. *In vitro*, foi demonstrado que o processo absorptivo dos carotenoides acontece por difusão facilitada. A mensuração *in situ* da absorção dos carotenoides apenas pelo balanço da ingestão/excreção ou pela resposta plasmática após a suplementação fornecem apenas uma indicação indireta da absorção intestinal, já que pode ocorrer síntese e degradação de carotenoides no rúmen e, reciclamento e excreção através da bile. Sendo assim, o mais indicado seria a mensuração através de marcadores com isótopos. Alguns trabalhos demonstraram a

superioridade dos suplementos sintéticos em alcançar teores plasmáticos satisfatórios de betacaroteno e vitamina A em relação aos vegetais. Entre os componentes da dieta, os lipídeos podem melhorar a biodisponibilidade dos carotenoides por facilitar a incorporação dos carotenoides nas micelas digestivas.

2.5.3 Bioconversão de betacaroteno a retinol

A conversão de betacaroteno a retinol (Vitamina A) ocorre principalmente na mucosa do intestino delgado por meio da enzima 15-15'-carotenoide dioxigenase (Figura 2). Essa bioconversão também pode ocorrer em outros órgãos, como no fígado (BOREL et al., 2005), corpo lúteo (MORALES et al., 2006) e útero (CHEW et al., 1982a). Schweigert e Eisele (1990), ao infundirem betacaroteno por via parenteral, observaram aumento na concentração de vitamina A no leite, mas não no plasma, sugerindo que pode ocorrer bioconversão de betacaroteno a retinol também na glândula mamária. Teoricamente, a enzima poderia clivar (seccionar) a molécula de betacaroteno pela metade formando duas moléculas de retinol ($C_{20}H_{30}O$). Entretanto, o *U. S. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board - IOM* (2001) considera a eficiência de conversão do betacaroteno a retinol de apenas 50%. Como este instituto assume eficiência de absorção do betacaroteno em sua forma sintética de 33%, seriam necessários 6 μg de betacaroteno para formar 1 μg de retinol no plasma. Van Lieshout et al. (2001), utilizando isótopos, avaliaram a bioeficácia de betacaroteno sintético diluído em óleo. Bioeficácia é a eficiência do metabólito ingerido de ser absorvido e convertido em seu princípio ativo. Os autores observaram a necessidade de ingestão de 2,4 μg de betacaroteno para formar 1 μg de retinol no plasma de crianças. Não foi possível calcular a

absorção e a bioconversão separadamente. Entretanto, estes dados sugerem valor de conversão a retinol bem acima do considerado pela IOM (2001) de 50%.

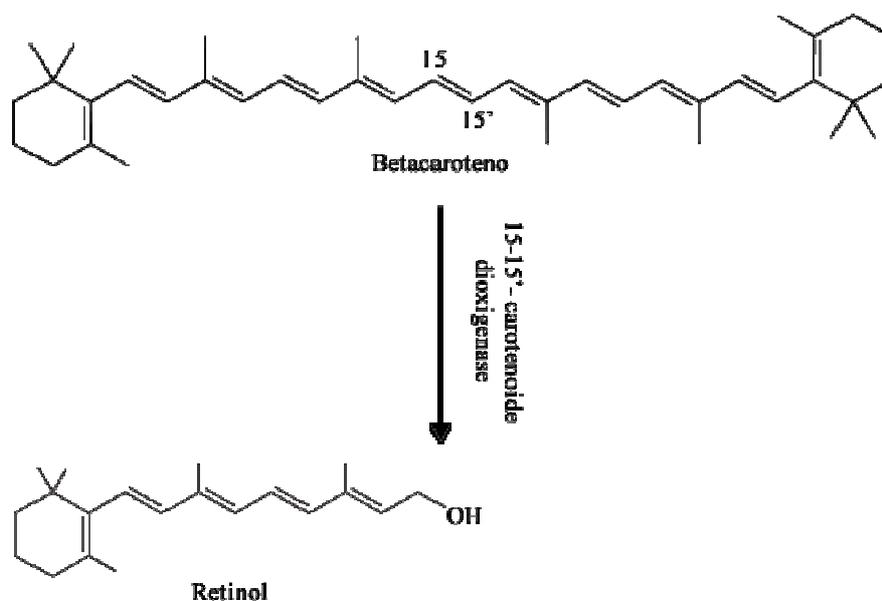


Figura 2 Biocoversão do betacaroteno a retinol

Yang e Tume (1993) demonstraram que houve maior conversão *in vitro* de betacaroteno a retinol com enzima 15-15'-carotenoide dioxigenase coletada no intestino de ovelhas que de vacas ou cabras. Vários trabalhos também demonstraram que existe efeito de raça na coloração do tecido adiposo ou no teor plasmático de betacaroteno e retinol em bovinos (GRAVES-HOAGLAND; HOAGLAND; WOODY, 1988; WALKER et al., 1990). A raça Holandesa tem tecidos e gorduras mais brancas comparado às Guernsey e Jersey que apresentam gorduras amareladas. Esses dados sugerem que há diferença na capacidade absorptiva e/ou na eficiência de conversão do betacaroteno a retinol entre raças de bovinos (DUNNE et al., 2008; NOZIÈRE et al., 2006; NRC, 2001; MCDOWELL, 2012).

Em experimento realizado com camundongos, Van Vliet et al. (1996) evidenciaram que a atividade enzimática de clivagem do betacaroteno no intestino foi determinada pelo teor dietético de vitamina A. Camundongos deficientes em vitamina A tiveram maior *atividade* da enzima 15-15'-carotenoide dioxigenase que camundongos suplementados com 12.000 Equivalentes de Retinol (ER)/kg de dieta ou 50 ppm da dieta de betacaroteno (8333 ER). Parvin e Sivakumar (2000) demonstraram que camundongos alimentados com dieta deficiente em proteína também tiveram menor capacidade de converter betacaroteno em vitamina A.

Mora et al. (2001), ao aumentar a suplementação de betacaroteno (Lucarotin 10%. BASF The Chemical Company, Ludwigshafen, Alemanha) de 5,5 para 352 ppm na MS da dieta de novilhos da raça Holandesa, não encontraram diferenças no teor de retinol, indicando que independentemente da dosagem, a quantidade de retinol formada foi similar e tendeu a estabilizar. Entretanto, vale ressaltar que o teor de retinol no plasma antes da suplementação estava acima de 1,0 µg/mL, valor considerado alto por Akar e Gazioglu (2006), podendo ter influenciado na conversão (VAN VLIET et al., 1996).

Como conclusão, foi encontrada atividade da enzima 15-15'-carotenoide dioxigenase no intestino, fígado, ovário, útero e glândula mamária. Teoricamente, a enzima poderia clivar a molécula de betacaroteno pela metade formando duas moléculas de retinol, porém a eficiência de conversão parece ser menor. Há um efeito genético importante entre espécies e raças na conversão e/ou absorção de carotenoides. Além disso, a eficiência de conversão do betacaroteno a retinol é influenciada negativamente pelo alto teor de retinol na dieta e plasma e, pelo baixo teor de proteína na dieta.

2.6 Transporte de carotenoides no corpo

Os carotenoides que se desprenderam da célula vegetal e que não sofreram bioconversão a retinol na mucosa do intestino, são absorvidos pelos enterócitos, incorporados aos quilomícrons e transportados via circulação linfática até o fígado, onde serão transferidos para lipoproteínas responsáveis pelo transporte no sangue até os tecidos (CARDINAULT et al., 2006; COMBS JR, 2012). Cardinault et al. (2006) avaliando a digestão de carotenoides em ovinos com cânula ruminal, duodenal e ileal, não detectaram carotenoides na veia porta após incubá-los no duodeno, demonstrando que o transporte dos carotenoides até o fígado ocorre via sistema linfático.

O betacaroteno, apesar de não representar a maior parte dos carotenoides em relação as xantofilas nas plantas (CHAUVEAU-DURIOT et al, 2005), em bovinos ele é o principal carotenoide circulante (YANG; LARSEN; TUME, 1992). Em bovinos cerca de 80% do betacaroteno plasmático está associado às lipoproteínas de alta densidade (SCHWEIGERT; RAMBECK; ZUCKER, 1987; YANG; LARSEN; TUME, 1992). Ovelhas e cabras apresentam menor teor plasmático de betacaroteno e maiores teores de xantofilas, principalmente luteína, do que bovinos. Além disso, cerca de 57% dos carotenoides estão associados às lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (YANG; LARSEN; TUME, 1992). A associação dos carotenoides com as lipoproteínas foi consistente com a composição plasmática das lipoproteínas entre as espécies. Entretanto, os autores não esclareceram as diferenças no perfil de carotenoides circulantes entre as espécies de ruminantes. Entretanto, os dados sugerem efeito genético na preferência dos enterócitos em captar um carotenoide em relação ao outro.

2.7 Concentração de carotenoides nos tecidos

A queda fisiológica no teor plasmático de betacaroteno de vacas leiteiras no período próximo ao parto, atingindo nível mínimo na primeira semana após o parto, tem sido frequentemente relatada (INABA et al, 1986a; MICHAL et al, 1994; KAEWLAMUN et al., 2011a). Este efeito é atribuído à drenagem destes compostos pela glândula mamária (colostrogênese) no final da gestação (BLOOD et al., 1988; GOFF et al., 2002). Goff et al. (2002) observaram que o teor plasmático de betacaroteno em vacas gestantes mastectomizadas foi superior ao de vacas controle no periparto. Foi detectado rápido aumento da expressão e atividade da enzima lipoproteína lipase e aumento na expressão de receptores de lipoproteínas na glândula mamária no período próximo ao parto. Isso explica as altas concentrações de lipídeos, colesterol e vitaminas lipossolúveis no colostro, já que essas substâncias são transportadas por lipoproteínas (RAMÍREZ et al., 1983; SCHWEIGERT, 1990; HERRERA, 2000). A captação do betacaroteno pela glândula mamária é o fator principal para a queda do teor plasmático de betacaroteno próximo ao parto, porém não é o único fator responsável. O consumo de betacaroteno por aumento do estresse oxidativo e a redução fisiológica da ingestão de matéria seca antes do parto também contribuem para este fato (GOFF et al., 2002).

Um mililitro de colostro contém 17 a 340 ng de betacaroteno (JOHNSTON; CHEW, 1984; KUME; TOHARMAT, 2001), enquanto que 1 ml de leite contém 40 a 117 ng de betacaroteno (CHEW et al., 1982b; JENSEN; JOHANNSEN; HERMANSEN, 1999; JOHNSTON; CHEW, 1984). Jensen, Johannsen e Hermansen (1999) demonstraram que a secreção diária de betacaroteno no leite segue a cinética de *Michaelis-Menten* para transporte ativo através de membranas. O processo foi saturável independentemente da produção de leite, alcançando a secreção máxima de 3,6 mg/d de betacaroteno (média de

2,5 mg/d). Além disso, a capacidade secretora foi influenciada pela genética paterna das vacas.

O fígado, sangue e tecido adiposo são considerados reservatórios de carotenoides nos animais, sendo que no fígado de bovinos, o principal carotenoide encontrado é o betacaroteno (KNIGHT et al., 1996; MORA et al., 2001; YANG et al., 2002; YANG; LARSEN; TUME, 1992). O teor de betacaroteno no fígado de novilhos da raça Holandesa e Hereford foi, respectivamente, de 7 e 8,1 µg/g de tecido úmido, e no tecido adiposo foi 0,8 e 3,7 µg/g de tecido úmido (MORA et al., 2001; YANG et al., 1992). O fígado desempenha papel importante na regulação da disponibilidade de carotenoides a outros tecidos por regular a incorporação dos carotenoides em lipoproteínas, a converção de carotenoides em vitamina A e a excreção de carotenoides pela bile, sendo que parte destes pode ser reabsorvido ou convertido a vitamina A nos enterócitos (NOZIÈRE et al., 2006).

Patterson (1965) encontrou relação linear e positiva entre o teor de carotenoides plasmáticos e o teor de ácidos graxos livres em vacas leiteiras em balanço energético negativo no início da lactação. Arias et al. (2009) observaram queda no teor de betacaroteno no tecido adiposo de bovinos ao estimularem a mobilização lipídica com epinefrina. Além disso, foi detectado acúmulo de lípidos e de betacaroteno no mesmo tecido ao usar insulina. Rosendo et al. (2010) estudaram a relação da infiltração gordurosa no fígado de vacas no início da lactação com os teores plasmáticos e hepáticos de betacaroteno e vitamina A. A queda fisiológica do teor hepático de betacaroteno no período próximo ao parto foi muito menor para vacas que apresentaram leve esteatose hepática do que para vacas saudáveis (8% e 68%, respectivamente). Além disso, foi detectado maior teor plasmático de vitamina A nas vacas saudáveis comparadas às doentes. Entretanto, não houve efeito no teor plasmático de betacaroteno. Esses dados sugerem que o papel regulatório do fígado em manter as concentrações

plasmáticas de vitamina A parece estar comprometido em vacas com leve acúmulo de gordura no fígado, porém o mecanismo não foi esclarecido.

A estrutura animal com o maior teor de carotenoides é o corpo lúteo, sendo sua cor característica formada por esses pigmentos (amarelo intenso). Chew et al. (1984), quantificando vitamina A e carotenoides em órgãos oriundos de abatedouro de bovinos, relataram que corpo lúteo tinha 4,7 vezes mais betacaroteno por grama de tecido úmido que o fígado (14,2 µg/g e 3 µg/g, respectivamente). Os autores correlacionaram os teores plasmáticos de vitamina A e betacaroteno com os seus teores no fluido folicular e corpo lúteo. No fluido folicular, os teores de vitamina A total, retinol, retinil e betacaroteno tiveram correlações positivas com seus respectivos teores plasmáticos. Os coeficientes de correlação linear foram de 0,61, 0,58, 0,54 e 0,43, respectivamente ($P < 0,01$). No corpo lúteo, somente retinol teve correlação significativa ($r = 0,57$) com seu teor plasmático.

A suplementação de marrãs com 100 mg de betacaroteno (Rovimix 10%, Hoffmann-La Roche, GrenzachWyhlen, Alemanha) aumentou em seis vezes a concentração de betacaroteno no corpo lúteo comparativamente ao controle (SCHWEIGERT et al., 2001). Schweigert et al. (2003) analisaram 43 corpos lúteos de vacas não gestantes, representando quatro estágios do ciclo luteal. Foi mensurada a concentração de betacaroteno, alfatocoferol e retinol. Os teores de betacaroteno e alfatocoferol aumentaram entre os estágios 1 (inicial) e 4 (final). Entretanto, houve queda no teor de retinol do estágio 1 ao estágio 4. Os autores sugeriram que o acúmulo de betacaroteno e tocoferol durante o desenvolvimento do corpo lúteo parece ser secundário à captação de colesterol para a síntese de progesterona, já que o betacaroteno, alfatocoferol e colesterol são transportados pelas mesmas lipoproteínas no sangue. Além disso, há um possível consumo de retinol durante a esteroidogênese, já que esta vitamina está ligada a produção de progesterona (WICKENHEISSER et al., 2005).

Herdt e Seymour (2003) analisaram amostras de sangue de um grande levantamento realizado nos Estados Unidos (NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM - NAHMS, 1996), 85% das amostras de soro de vacas leiteiras continham teor médio menor que 3,0 µg/mL de betacaroteno, o nível plasmático sugerido por Frye, Williams e Graham (1991) para promover efeitos benéficos sobre a reprodução. Os animais sem acesso a pasto tiveram teores séricos de betacaroteno de $1,68 \pm 1,64$ µg/mL e os com acesso a pasto de $2,41 \pm 2,0$ µg/mL. Em outro levantamento realizado em 20 rebanhos canadenses, a média de 1828 amostras sanguíneas de vacas leiteiras no periparto foi $1,12$ µg/mL $\pm 0,78$ (LEBLANC et al., 2004).

Em camundongos alimentados por 147 dias com dieta contendo 0,2% de betacaroteno seguido por período de depleção, o tempo de meia vida do betacaroteno no plasma foi 3,5 dias (SHAPIRO et al., 1984). Os tempos de meia vida foram 9, 16 e 15 dias no fígado, adiposo (da glândula adrenal) e ovários, respectivamente. Gugger et al. (1992) administraram uma dose oral única de 10 mg/kg de peso vivo de betacaroteno a furões (*Mustela putorius furo*). Foi observado pico nos teores séricos de betacaroteno oito horas após a suplementação (1,8 µmol/L) e retorno a níveis basais após 3,3 dias (GUGGER et al., 1992). Em marrãs, com teores plasmáticos de betacaroteno abaixo de 10 µg/mL, dose única de 70 mg de betacaroteno (Carofertin. Alvetra&Werfft AG, Neufeld an der Leitha, Áustria), por administração intramuscular, induziu pico de betacaroteno no plasma de $13,8 \pm 5,8$ µg/mL após 24 horas. O tempo de meia vida no plasma foi $7,2 \pm 1,4$ horas após o pico (KRAMMER; AURICH, 2008).

Burri et al. (2001) avaliaram o tempo de meia vida do betacaroteno sérico em humanos. Nove mulheres foram suplementadas com 1,5 mg/d de betacaroteno por quatro dias seguido por período de depleção de 68 dias com dieta pobre em carotenoides (0,07 mg/d). O tempo de meia vida do betacaroteno

sérico foi 37 dias. Em todo período experimental houve suplementação com 100% das recomendações de vitaminas A, C e E.

Mora et al. (2001) avaliaram o efeito da suplementação de 0, 5,5, 44 e 352 ppm na MS da dieta de betacaroteno (Lucarotin 10%. BASF *The Chemical Company*, Ludwigshafen, Alemanha) nos teores teciduais de betacaroteno de novilhos da raça Holandesa que passaram por período de depleção com dieta isenta de forragens frescas (0,004 ppm de betacaroteno na MS). Os novilhos pesavam 346 kg \pm 53. O consumo estimado de matéria seca da dieta foi 7,5 kg/novilho/d. O teor plasmático de betacaroteno antes do período de depleção era 1,6 μ g/mL. A queda no teor plasmático de betacaroteno foi linear, sendo necessários 49 dias para ele se tornar nulo no plasma. O tempo de meia vida foi próximo de 25d. Após a fase de depleção, os animais foram mantidos na mesma dieta basal e em 30 dias o teor plasmático de betacaroteno alcançou 3,5 μ g/mL no tratamento com 352 ppm na MS de betacaroteno da dieta e de pouco mais de 1 μ g/mL nos tratamentos com 5,5 e 44 ppm na MS de betacaroteno da dieta. Após 30 dias de suplementação, os teores de betacaroteno no fígado e tecido adiposo foram, respectivamente, 8,1 e 3,7 μ g/g de tecido úmido no tratamento 352 ppm na MS de betacaroteno e de 0,8 e 0,07 μ g/g, respectivamente, no tratamento controle. Esse resultado demonstra a grande capacidade destes tecidos em estocar betacaroteno. O fígado é a principal reserva de vitamina A do corpo, apresentando teor de retinol 20 a 100 vezes maior que betacaroteno em bovinos (FRYE; WILLIAMS; GRAHAM, 1991; MORA et al., 2001; YANG et al., 1992). Mesmo depois dos animais terem enfrentado longo período de depleção, o teor de retinol no plasma antes da suplementação estava acima de 1,0 μ g/mL, valor considerado alto por Akar e Gazioglu (2006), sugerindo que as reservas de vitamina A no corpo são muito mais lábeis que as de betacaroteno.

A suplementação com 330 mg/d de betacaroteno sintético foi necessária para elevar em 30d o teor plasmático de betacaroteno de 0 a 1 μ g/mL de

novilhos pesando 346 kg (MORA et al., 2001). Bovinos têm 8% do peso vivo em sangue (KOLB, 1984). Houve, assim, acréscimo plasmático médio de 0,9 mg/d de betacaroteno. Extrapolando esses dados para vacas em lactação, em manejos nutricionais baseados em forragens conservadas, a secreção diária de betacaroteno no leite pode ser relevante, 2,5 mg/d (JENSEN; JOHANNSEN; HERMANSEN, 1999).

Concluindo, vacas no periparto enfrentam redução expressiva no teor plasmático de betacaroteno devido a colostrogênese, porém não é o único fator responsável. O fígado, sangue e tecido adiposo são considerados reservatórios de betacaroteno em vacas. A suplementação de betacaroteno eleva os teores do carotenoide no corpo lúteo. O tempo de meia vida do betacaroteno plasmático em novilhos e em mulheres foi mais alto que em camundongos, furões e marrãs. Essa diferença pode estar relacionada ao tamanho da reserva do carotenoide no corpo e o estado metabólico do animal (catabolismo ou anabolismo), já que há relação positiva entre o teor de betacaroteno plasmático e o teor de ácidos graxos livres no sangue. O tempo de meia vida do betacaroteno plasmático em novilhos é de 25 dias. A secreção diária de betacaroteno no leite pode ser relevante (2,5 mg/d) em manejos nutricionais baseados em forragens conservadas. Em dois grandes levantamentos foram observados baixos teores plasmáticos de betacaroteno em vacas leiteiras, sugerindo a necessidade de suplementar betacaroteno.

2.8 Estresse oxidativo e as espécies reativas de oxigênio

O metabolismo aeróbico em sistemas biológicos é associado a geração de pró-oxidantes como as espécies reativas de oxigênio. Na cadeia transportadora de elétrons o oxigênio molecular (O_2) serve como um receptor recebendo quatro elétrons e quatro prótons até o final da reação (redução

tetravalente), resultando na formação de duas moléculas de água (H_2O). Entretanto, esta reação de redução é parcial devido a adição de um elétron de cada vez, sendo que durante esse processo podem ser formados intermediários reativos, como os radicais hidroxila (OH^\cdot), hidroperoxila (HO_2^\cdot), superóxido (O_2^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A produção de espécies reativas de oxigênio também é necessária em algumas funções celulares, como na síntese da tiroxina na glândula tireoide e no processo de fagocitose dos microrganismos pelos neutrófilos e macrófagos que utilizam o peróxido de hidrogênio (explosão respiratória) para destruir os patógenos (PAAPE et al., 2002). Uma variedade de outros processos biológicos como o envelhecimento, inflamação, carcinogênese, danos radioativos e efeitos fotobiológicos também estão envolvidos com as espécies reativas de oxigênio (CHANCE et al., 1979).

O estresse oxidativo acontece quando há um desbalanço da relação de equilíbrio pró-oxidante/antioxidante, no sentido dos pró-oxidantes (SIES, 1991). Essas moléculas instáveis e altamente reativas são capazes de danificar biologicamente moléculas presentes nas células, como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos de membrana (PRYOR, 1986).

Algumas dessas espécies, como o radical hidroxila e o oxigênio molecular singlete, têm tempos de meia-vida tão curtos (1×10^{-9} e 1×10^{-6} segundos, respectivamente) que a linha de defesa antioxidante (alfatocoferol, ascorbato e glutatona por exemplo) dificilmente os intercepta, cabendo a esses antioxidantes um papel maior atuando apenas como um preventivo ou, então, como reparador das moléculas afetadas (PRYOR, 1986). Entretanto, foi relatada alta eficiência em interceptação das moléculas excitadas de oxigênio singlete pelos carotenoides em meios biológicos (TELFER et al., 1994).

Quando uma molécula de O_2 no estado fundamental absorve energia, e um elétron é excitado para orbitais em níveis mais altos de energia, pode-se

formar oxigênio singlete ou triplete, dependendo do spin do elétron excitado (SIES et al., 1991). Em meios biológicos animais, a formação de oxigênio singlete foi evidenciada a partir de reações envolvendo enzimas peroxidases, na peroxidação lipídica, na exposição a raios ultravioleta e também no processo de fagocitose de patógenos pelas células de defesa (SIES et al., 1991). Em organismos vegetais a energia necessária para excitar um elétron é absorvida através de reações que envolvem a luz (TELFER et al., 1994).

O oxigênio singlete formado pode reagir com outras moléculas provocando danos ao DNA e aos carboidratos (SIES et al., 1995). Lipossomas expostos ao oxigênio singlete sofreram peroxidação lipídica em suas membranas. A peroxidação lipídica foi mensurada através do aumento de alguns produtos da degradação das membranas lipídicas, como o malondialdeído (KRISKY; DENEKE, 1982). Telfer et al. (1994) demonstraram o papel direto do oxigênio singlete em causar danos oxidativos dentro de um meio biológico (tecido fotossintético isolado da planta *Pisum sativum*) mensurados através do branqueamento das clorofilas. O processo de supressão física do oxigênio singlete é predominantemente realizado, em meios biológicos, pelos carotenoides, embora os tocoferóis (vitamina E) também podem desempenhar, em menor escala, essa atividade (SIES et al., 1995). Entretanto, ainda não foi provado se a formação de moléculas instáveis de oxigênio singlete em organismos animais é significativa o bastante para causar doenças (SIES et al., 1995).

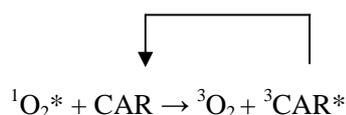
2.9 Comportamento e mecanismos de atuação do betacaroteno como um antioxidante

O betacaroteno é uma molécula lipofílica e, portanto, solúvel nas membranas celulares. O sistema de duplas ligações conjugadas confere alta

reatividade química a esse composto, protegendo moléculas importantes da ação dos radicais livres, peróxidos e do oxigênio singlete, o caracterizando como um antioxidante (BURTON; INGOLD, 1984).

2.9.1 Supressão física do oxigênio singlete

Telfer et al. (1994) demonstraram que o betacaroteno pode agir como um eficiente supressor de moléculas de oxigênio singlete geradas dentro de um sistema fotossintético biológico, por diminuir o branqueamento das clorofilas. O branqueamento é causado pela reação foto-oxidativa do oxigênio singlete com as clorinas presentes nas clorofilas. Anderson e Krinsky (1973) demonstraram *in vitro* a ação protetora do betacaroteno contra danos foto-oxidativos aos lipossomas causados pelo oxigênio singlete, mensurando malondialdeído. Farmilo e Wilkinson (1973) demonstraram que a transferência de energia é o principal mecanismo da proteção dos carotenoides contra o oxigênio singlete (reação abaixo). Uma vez produzido, o caroteno triplete ($^3\text{CAR}^*$) pode facilmente retornar ao seu estado normal (retorno dos elétrons para camadas eletrônicas menos excitadas) dissipando a energia gerada como forma de calor (EDGE et. al., 1997).

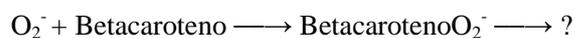
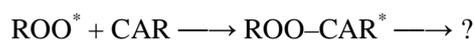


2.9.2 Reação dos carotenoides com os radicais livres

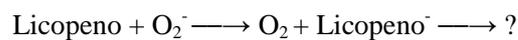
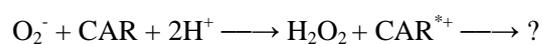
Assim como a habilidade de suprimir moléculas em estado excitado, os carotenoides podem reagir com os radicais livres. Entretanto, diferentemente da supressão física do oxigênio singlete em que o carotenoide triplete voltaria ao

estado menos excitado eliminando a energia em forma de calor, estas reações com os radicais livres são de transferência de cargas ou de adição de radicais, sendo que os elétrons ou os produtos formados não são perdidos (EDGE et al., 1997). O destino destes compostos formados ainda não está totalmente claro (KRINSKY; YEUM, 2003). Estes últimos autores citaram que há pelo menos três possíveis mecanismos envolvendo as reações de carotenoides com os radicais livres. Elas incluem: (1) adição de radical, (2) transferência eletrônica e (3) abstração do hidrogênio.

(1) Reações de adição. O radical peroxila (ROO^*) pode se adicionar em qualquer lugar da cadeia poliênica dos carotenoides (CAR), resultando na formação de radical carbono-centrado (ROO-CAR^*), uma vantagem desta reação é o impedimento da peroxidação lipídica nas membranas celulares por exemplo, já que o produto formado apresenta ser mais estável que o radical peroxila. Foi demonstrado que o ânion superóxido (O_2^-) também pode se adicionar à molécula de betacaroteno. As reações estão descritas abaixo. O sinal de interrogação refere-se ao destino incerto dessas moléculas formadas.

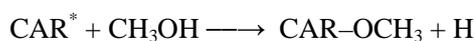
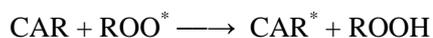


(2) Transferência de elétrons. Estas reações resultam na formação de radicais cátions (CAR^+) ou ânions (CAR^-), dependendo das espécies envolvidas. Abaixo, seguem algumas reações com os carotenoides.

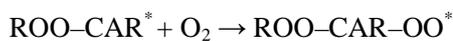
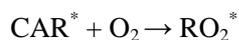


(3) Abstração de hidrogênio. A característica principal desta reação é a remoção do átomo de hidrogênio (neutro ou carregado) de uma entidade molecular. Abaixo, seguem algumas reações com os carotenoides.





Foi descoberto que os carotenoides, em situações de altas pressões de oxigênio (>150 mmHg, 20% O₂) e também em altas concentrações do próprio composto, podem agir de forma antagônica, como pró-oxidante, ao formar moléculas reativas como os peróxidos (BURTON; INGOLD, 1984; MARTIN et al., 1999); as reações estão descritas abaixo. Entretanto, já que a pressão parcial de oxigênio fisiológica em animais é bem menor que 150 mmHg, foi sugerido que o efeito pró-oxidante, devido a essa situação, deva ser pequeno (EDGE et al., 1997).



Rahman e Parker (2001) estudaram a atividade biológica de produtos da degradação de carotenoides. Houve inibição da proliferação de células T e B em camundongos expostos a esses produtos. Siems et al. (2002) detectaram queda

nos teores plasmáticos de glutatona, aumento nos teores de MDA, inibição da atividade de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase e diminuição do terceiro estágio da respiração celular de mitocôndrias hepáticas em camundongos expostos a alguns produtos de degradação dos carotenoides. Esses produtos podem se formar em situações de alto estresse oxidativo como em pacientes fumantes ou trabalhadores expostos ao amianto.

2.9.3 Interação com outros antioxidantes

Existe uma relação de proteção ou regeneração entre os antioxidantes. Em dietas deficientes em alfatocoferol e selênio, Mayne et al. (1989) observaram aumento nos teores plasmáticos de alfatocoferol ao suplementar cantaxantina, um carotenoide, em humanos. Além disso, houve queda na peroxidação lipídica das membranas celulares, sugerindo um efeito de proteção ou regeneração dos carotenoides sobre o alfatocoferol. Packer (1993) estudou o efeito antioxidante dos carotenoides e alfatocoferóis, *in vitro* e *in vivo*, sobre as lipoproteínas de baixa densidade em humanos. Foi observado que as moléculas de betacaroteno, nestas proteínas, eram degradadas ao serem expostas à luz UV no comprimento de onda de 295 nm, situação em que, segundo o autor, só destruiria diretamente as moléculas de alfatocoferol, implicando assim, também, uma possível interação de proteção ou regeneração entre o radical alfatocoferoxil e o betacaroteno. Böhm et al. (1997) investigaram os mecanismos moleculares relacionados a esses efeitos e demonstraram que os carotenoides são convertidos aos seus radicais cátions (oxidados) na presença do radical tocoferoxil, o reduzindo à alfatocoferol. Também foi demonstrado que o ácido ascórbico pode regenerar os cátions de radical carotenoide em solução de metanol. Edge et al. (1997) sugeriram que em meio biológico, os cátions de radicais carotenoides presentes nas membranas celulares podem se reorientar de forma a ter contato

com a face polar da membrana, ficando acessível ao ácido ascórbico presente na fase aquosa dos meios biológicos. Segue abaixo um esquema que representa estes experimentos (Figura 2). Parece estar relacionado a este fato, algumas pesquisas em que a suplementação de betacaroteno não diminuiu o risco de desenvolver câncer de pulmão em pacientes fumantes, mas diminuiu o risco em pacientes não fumantes (MAYNE et al., 1994; OMENN et al., 1996), já que segundo Combs Jr (2012), o ato de fumar pode diminuir o teor plasmático de vitamina C em 40%.

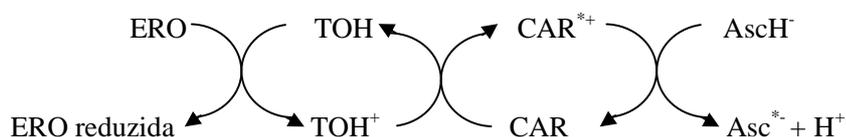


Figura 3 Interação entre os antioxidantes alfatocoferol (TOH), carotenos (CAR) e ácido ascórbico (ASCH) e com as espécies reativas de oxigênio (ERO).

2.10 Relação da suplementação de antioxidantes com o estado oxidativo de vacas leiteiras no pré-parto

Chawla e Kaur (2004) detectaram correlação positiva entre o teor plasmático de betacaroteno e a capacidade antioxidante em vacas suplementadas com betacaroteno antes do parto ($r=0,73$). A capacidade antioxidante foi mensurada pelo método de redução do ferro (FRAP). Neste método, o complexo férrico tripiridiltriazina (Fe^{+3} - TPTZ) é reduzido ao ferroso (Fe^{+2} - TPTZ), mudando sua coloração para azul na presença de antioxidantes em pH ácido (BENZIE; STRAIN, 1996). Esse achado suporta experimentos prévios o qual a suplementação de antioxidantes antes do parto melhorou alguns índices de saúde em vacas leiteiras (SMITH et al., 1984; WEISS et al., 1990a, MICHAL et al., 1994). Foi sugerido que há necessidade de suplementar betacaroteno durante o período pré-parto a fim de melhorar o nível de antioxidantes no plasma e,

consequentemente, o estado oxidativo, o que poderia refletir nos índices de saúde no início da lactação (CHAWLA; KAUR, 2004).

Entretanto, nem sempre a suplementação de antioxidantes melhora o estado oxidativo dos animais. Após observar resultado negativo e inesperado da suplementação pré-parto com vitamina E (3.000 UI/d) no índice de mastite pós-parto em vacas de leite, Bouwstra et al. (2010) avaliaram retrospectivamente quais parâmetros fisiológicos, mensurados no dia antes da suplementação (T0, 8 semanas do parto previsto), influenciaram na resposta da suplementação com vitamina E no pré- e pós-parto destas vacas leiteiras. Testando a hipótese sugerida por Nwose et al. (2008) de que a suplementação de vitamina E para indivíduos com teores plasmáticos insuficientes de compostos que reduzem ou “regenerem” o radical tocoferoxil à alfatocoferol poderia aumentar o estresse oxidativo, a equipe separou as vacas em grupos pela combinação de três parâmetros fisiológicos no T0: 1) Estado oxidativo – espécies reativas de oxigênio plasmáticas (ERO) maior ou menor que 40 U/mL. 2) Vitamina E plasmática – maior ou menor que 16 $\mu\text{mol/L}$. 3) Suficiência do sistema regenerador de vitamina E (VERS) - suficiente ou insuficiente, de acordo com uma série de combinações, utilizando o FRAP, a relação glutatona reduzida pela glutatona oxidada (antioxidante natural) e o teor de glutatona peroxidase no plasma.

As vacas suplementadas com vitamina E em dois grupos, considerados insuficientes no VERS no T0, tiveram teor mais alto de ERO duas semanas pré-parto comparadas com as vacas consideradas suficientes, indicando aumento do estresse oxidativo. As vacas suplementadas com vitamina E do grupo com teor plasmático de vitamina E $>16 \mu\text{mol/L}$ tiveram teor plasmático mais alto de malondialdeído (MDA), produto de degradação das membranas celulares ao sofrer peroxidação lipídica, indicando também aumento do estresse oxidativo.

Foram relacionados os teores plasmáticos de ERO e MDA no pré-parto de vacas que desenvolveram ou não mastite no início da lactação. As vacas que desenvolveram mastite, e que foram suplementadas com vitamina E, pareceram apresentar maiores teores de ERO e MDA no pré-parto ($P=0,21$ e $P=0,14$, respectivamente). Vacas com altos teores plasmáticos de ERO e MDA tiveram 2,8 vezes mais risco de desenvolver mastite (95% CI, 1,1 – 7,1). Ou seja, vacas que aumentaram o estresse oxidativo ao serem suplementadas com vitamina E tiveram mais chances de desenvolver mastite. O equilíbrio entre os antioxidantes do corpo é necessário para manter o estado redox do animal, já que há um sistema de regeneração entre eles. Nem toda vaca precisa da suplementação de vitamina E. A suplementação extra de vitamina E no pré-parto de vacas leiteiras sem conhecer o teor plasmático de vitamina E e a capacidade do sistema antioxidante de regenerar a vitamina E pode aumentar o estresse oxidativo ao invés de diminuí-lo.

Hipoteticamente, esta conclusão pode valer para outros antioxidantes suplementáveis como a vitamina C e o betacaroteno, já que também para eles há um sistema de regeneração conhecido (COMBS JR, 2012; KRINSKY; YEUM, 2003). Não existem ainda valores de corte seguros para considerar adequada ou não a relação entre os antioxidantes no plasma de vacas (BOUWSTRA et al., 2010). Pesquisas nesta linha são necessárias no desenvolvimento de tecnologias de monitoramento de rebanhos que permitirão maior acurácia na resposta à suplementação de antioxidantes.

2.11 Estado metabólico, oxidativo e função imune de vacas leiteiras no periparto

Várias alterações hormonais e metabólicas acontecem em vacas leiteiras na transição do final da gestação ao início da lactação. O aumento do cortisol

dias antes do parto ou em situações estressantes não naturais afeta a atividade leucocitária. O cortisol é reconhecido por ser um agente imunossupressor por se ligar aos receptores leucocitários, impedindo-os de migrar para os tecidos alvos e também por diminuir sua capacidade de destruição dos patógenos. Várias alterações metabólicas e ambientais em torno do parto, como a hipocalcemia, o balanço energético, o estado oxidativo e o estresse térmico têm papel na imunossupressão do periparto (BASCHANT; TUCKERMANN, 2010).

O sistema antioxidante de vacas leiteiras é suficientemente robusto para lidar com a produção de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres na condição fisiológica da transição do final da gestação à lactação. Castillo et al. (2005) detectaram aumento natural na produção de antioxidantes em vacas de leite expostas ao aumento de radicais livres, provavelmente devido ao esforço físico do parto. Entretanto, quando ocorre produção elevada de pró-oxidantes nesta fase, a capacidade antioxidante do corpo será excedida e estresse oxidativo se desenvolverá (BERNABUCCI et al., 2005; CASTILLO et al., 2005). Foi detectado maior estresse oxidativo no pré-parto de vacas leiteiras que tiveram maior variação no escore de condição corporal entre o pré e pós-parto (BERNABUCCI et al., 2005). Castillo et al. (2005) correlacionaram alguns índices metabólicos de vacas leiteiras com o estado oxidativo no período de transição pré-parto. Houve correlação positiva ($r=0,61$) entre o teor plasmático de ácidos graxos não esterificados e o teor plasmático de malondialdeído (MDA), e correlação negativa ($r=-0,52$) entre o teor plasmático de glicose e o de MDA. Esses dados sugerem uma possível relação do balanço energético e possíveis outras desordens metabólicas com o estado oxidativo. Bernabucci et al. (2002) demonstraram que vacas no período de transição pré-parto expostas a moderado estresse térmico no verão tiveram maior estresse oxidativo que vacas parindo na primavera.

Na resposta imune inicial, espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres são utilizados pelos linfócitos para combater organismos estranhos. O excesso de pró-oxidantes podem trazer danos às células imunes se o sistema antioxidante do animal estiver debilitado, já que membranas contêm alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, muito susceptíveis a peroxidação. Estes fatores fazem com que o sistema imune durante o período próximo ao parto fique enfraquecido, o que pode ser fator predisponente à ocorrência de enfermidades relacionadas ao sistema imune, como retenção de placenta, metrite e mastite (BERNABUCCI et al., 2002, CASTILLO et al., 2005, LEBLANC et al., 2004; MALLARD et al., 1998). Assume-se que a relação da hipocalcemia com retenção de placenta está mais relacionada com a diminuição da função imune pelos baixos teores plasmáticos de cálcio do que pela baixa motilidade uterina (KIMURA et al. 2006; LEBLANC, 2008).

Grommers et al. (1989) estudaram a responsividade das células do sistema imune de vacas leiteiras em diferentes fases da lactação. Foi detectado menor resposta a desafio com endotoxina de *Escherichia coli* na glândula mamária em vacas no início da lactação do que em vacas no meio e final da lactação. A fagocitose pelos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) é a mais efetiva defesa contra a infecção bacteriana. Ao entrar em contato com bactérias, os PMN liberam potentes radicais livres que as matam enquanto as fagocitam (PAAPE et al., 2002). Mehrzad et al. (2001) observaram queda na produção de espécies reativas de oxigênio pelos PMN em vacas no início da lactação (MEHRZAD et al., 2001).

Durante a fase final da gestação alguns mecanismos induzem a maturação e o descolamento da placenta. Fatores como a ação de algumas enzimas e células inflamatórias são essenciais neste processo. Gunnink (1984a) observou que cotilédones colhidos de vacas leiteiras com retenção de placenta (RP) tiveram menor quimioatração de leucócitos que cotilédones colhidos de

vacas que expulsaram a placenta. Os leucócitos coletados alguns dias antes do parto de vacas que desenvolveram RP foram menos capazes de reconhecer o tecido cotiledonário num ensaio de quimiotaxia do que leucócitos de vacas sem RP. A baixa atividade quimiotática de leucócitos aos cotilédones de vacas que desenvolveram RP foi vista antes, durante e depois do parto nesses estudos (GUNNINK, 1984a, 1984b, 1984c).

A menor responsividade dos neutrófilos aos quimioatrativos em vacas com retenção de placenta foi confirmada por outros autores (CAI et al., 1994; HEUWIESER; GRUNERT, 1987; ROMANIUKOWA et al., 1984). Kimura et al. (2002) estudaram a função neutrofílica de 142 vacas leiteiras no periparto, avaliando a atividade quimiotática e de destruição destas células. Houve retenção de placenta em 14,1% das vacas. Os neutrófilos coletados no pré-parto de vacas que desenvolveram RP apresentaram diminuição na capacidade de migração ao tecido placentário. Além disso, foi detectado menor capacidade de destruição de patógenos destas células. Hammon et al. (2006) observaram queda na função neutrofílica e na ingestão de matéria seca no pré-parto de vacas que desenvolveram alguma doença uterina no início da lactação. A redução da função neutrofílica semanas antes do parto sugere que o enfraquecimento da função imunológica inata possa ser mais causa do que consequência de doenças uterinas em vacas leiteiras.

Eiler e Hopkins (1992) observaram, ao incubar seções de placentomas com bactérias produtoras de collagenase, relação negativa entre a retenção de placenta e a degradação do colágeno placentário. Eiler e Hopkins (1993) injetaram 200.000 unidades de collagenase na artéria umbilical 24 a 36 horas após a retenção de placenta. Houve liberação da placenta em 85% das vacas. Quando a enzima foi administrada na veia jugular houve eficiência de 50%. Neutrófilos e outros leucócitos são fontes móveis de enzimas collagenases (BURKHARDT; HARTMANN; SCHWINGEL, 1985; MURPHY et al., 1977).

Sendo assim, neutropenia ou qualquer fator que diminua a quimioatração da placenta pelos neutrófilos pode levar à falha da liberação da placenta.

Retenção de placenta tem sido constantemente associada ao aumento no risco sobre outras doenças como a cetose, o deslocamento de abomaso, a metrite, a endometrite e a mastite (CORREA et al., 1993; ERB et al., 1985; GRÖHN et al., 1990; LEBLANC et al., 2002; OLTENACU et al., 1990). Oltenu et al. (1990) demonstraram que a retenção de placenta aumentou o risco de cetose em 1,7 vezes, mastite em 1,5 vezes e metrite em 10 vezes. Além disso, a retenção de placenta, quando provoca metrite, está associada à diminuição em até 16% na taxa de prenhez (FOURICHON et al., 2000).

2.12 Ação do betacaroteno na resposta imune afetando a saúde

2.12.1 Estudos *in vitro*

Bendich e Shapiro (1986) detectaram maior proliferação de linfócitos T e B *in vitro* quando camundongos foram alimentados com 0,2 % do peso vivo de betacaroteno ou cantaxantina em comparação a camundongos do tratamento controle. Cantaxantina não apresenta atividade de vitamina A, vitamina com atividade imunomodulatória conhecida (COMBS JR, 2012). Sendo assim, foi concluído que o efeito dos carotenoides sobre o sistema imune se deve também a uma propriedade além de sua bioconversão à vitamina A. A vitamina A age no processo de diferenciação das células imunes, aumenta a mitogênese de linfócitos e também pode influenciar a capacidade fagocítica de monócitos e macrófagos (COMBS JR, 2012).

Neutrófilos polimorfonucleares (PMN) incubados com betacaroteno apresentaram maior eficiência bactericida comparados ao controle. Além disso, não foi detectado dano em suas membranas celulares durante o combate aos

microrganismos, causados pelas espécies reativas de oxigênio produzidas durante a explosão respiratória (ANDERSON; THERON, 1990).

Tjoelker et al. (1988) alocaram 30 vacas holandesas a três tratamentos. O tratamento VA recebeu 53.000 UI de palmitato de retinol/d, o tratamento AVA recebeu 213.000 UI de palmitato de retinol (alta suplementação) e o tratamento VA + BC recebeu 400 mg de betacaroteno + 53.000 UI de palmitato de retinol misturados à ração. A suplementação foi realizada por 42 dias antes (D-42) até 14 dias (D14) após a interrupção da lactação (D0). O teor plasmático de vitamina A no D-42 não diferiu estatisticamente entre os tratamentos e estava dentro do teor ótimo de 0,25-0,80 $\mu\text{g/mL}$ (AKAR E GAZIOGLU, 2006). Entretanto, o teor plasmático de betacaroteno estava abaixo do recomendado, de 3 $\mu\text{g/mL}$ (FRYE; WILLIAMS; GRAHAM, 1991). Após a suplementação houve queda no teor plasmático de vitamina A nos tratamentos VA e AVA e tendência de aumento no VA + BC, ao longo do experimento. Não houve efeito sobre o teor plasmático de betacaroteno nos tratamentos VA e AVA, porém houve aumento de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ no D0 para 4 $\mu\text{g/mL}$ no D14. Neutrófilos polimorfonucleares (PMN) sanguíneos isolados no D0 e D14 foram incubados com retinol nas concentrações 0, 10^{-6} e 10^{-7} M, ácido retinoico nas concentrações 0, 10^{-7} e 10^{-8} M, betacaroteno nas concentrações 0, 10^{-5} e 10^{-6} M ou solução basal na presença de *Staphylococcus aureus* para avaliar a habilidade fagocítica e bactericida destas células. Houve melhora no índice fagocítico e bactericida dos PMN isolados no D14 e incubados com betacaroteno nos tratamentos VA e AVA e efeito nulo no tratamento VA + BC. Houve efeito nulo e/ou negativo nestes índices para todos os tratamentos incubados com retinol ou ácido retinoico. Os autores concluíram que a incubação de PMN isolados no D14 com betacaroteno só melhorou a eficiência de combate contra os patógenos em animais com teores plasmáticos subótimos de betacaroteno (tratamentos VA e AVA). Além disso, os dados sugerem que a incubação com diferentes formas de

vitamina A (retinol ou ácido retinoico) pode ser tóxica em animais com teor plasmático adequado de vitamina A.

Daniel et al. (1991a, 1991b) observaram maior proliferação de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos) isoladas do leite e do sangue de vacas leiteiras e incubadas com betacaroteno na concentração 10^{-9} M ao serem induzidas a sofrer mitose pela concanavalina A. Não houve efeito da concentração 10^{-8} e 10^{-9} M de retinol ou da concentração 10^{-9} e 10^{-10} M de ácido retinoico sobre a proliferação induzida destas células. Os autores não mensuraram os teores plasmáticos de betacaroteno e vitamina A durante o experimento.

Foi avaliada a habilidade do produto OxC-beta (Avivagen, Ottawa, Canadá) de afetar a expressão de genes relevantes à resposta imune (BURTON et al., 2014). Fibroblastos humanos foram incubados com 5 μ mol/L de OxC-beta e desafiados com lipopolissacarídeo indutor de mitose para mimetizar uma condição de infecção. O OxC-beta aumentou a expressão de genes associados com o reconhecimento dos patógenos, como os responsáveis pela expressão dos receptores Toll-like e suas moléculas de suporte. O produto também reduziu a expressão de genes responsáveis pelo processo inflamatório, como os que expressam as citocinas e os receptores de citocinas e regulou a expressão de moléculas de transdução de sinais envolvidas na resposta inflamatória, como as inibidoras e mediadoras da inflamação. Esses resultados sugerem que estes monômeros e polímeros de betacaroteno encontrados no produto OxC-beta podem influenciar diversas respostas celulares associadas com o processo imune inato.

2.12.2 Ação na glândula mamária

Rakes et al. (1985) alimentaram 70 vacas Holandesas com dieta baseada em silagem de alfafa ou silagem de milho. Dentro desse grupo, as vacas foram alocadas aos tratamentos 0 ou 300 mg/d de betacaroteno (Rovimix. Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, Estados Unidos). As dietas continham teores adequados de vitamina A (3.919 UI/kg MS) e as vacas foram suplementadas com betacaroteno do parto até 100 dias em lactação. Não houve diferença entre os tratamentos no teor plasmático de betacaroteno ao parto (2,6 µg/mL). As vacas suplementadas com betacaroteno retomaram esse teor de betacaroteno plasmático por volta de 45 dias após o parto e atingiram pico de 3,0 µg/mL no dia 75 após o parto. As vacas não suplementadas atingiram pico de 2,4 µg/mL no dia 75 após o parto. Os animais alimentados com silagem de alfafa e suplementados com betacaroteno tiveram menor contagem de células somáticas no leite que os não suplementados (114 ± 32 vs. 459 ± 190 células/mL), indicando melhor saúde da glândula mamária.

Wang et al. (2013) suplementaram 316 vacas por infusão oral de 5 g de betacaroteno (Rovimix. DSM Nutritional Products Ltd., Parsippany, Estados Unidos) nos dias -23, -12 e 0 relativos ao parto. Os autores observaram menor incidência de mastite em primíparas suplementadas (64,0 vs. 52,9%), mas não em multíparas (45,3 vs. 51,0%).

Bian et al. (2007) avaliaram o efeito da suplementação de betacaroteno sobre a saúde de vacas leiteiras em três experimentos. Setenta e cinco vacas foram suplementadas com 0, 300 ou 500 mg/d de betacaroteno (Rovimix. DSM Nutritional Products Ltd., Queensland, Austrália) no experimento 1 e 2 e com 0 ou 300 mg/d no experimento 3. A suplementação foi 21 dias do parto previsto até 70 dias após o parto. O teor plasmático de betacaroteno antes da suplementação foi em média 1,2 µg/mL. No experimento 1, as vacas suplementadas com betacaroteno tiveram maior teor plasmático de betacaroteno nos dias 10 (0,9 vs. 0,5 µg/mL) e 60 após o parto (1,2 vs. 0,4 µg/mL). Houve

redução na taxa de mastite dos animais suplementados com betacaroteno em relação ao tratamento controle, as taxas foram 0, 4,3 e 13,6% para os tratamentos 500, 300 mg e controle, respectivamente, porém não houve diferença entre o tratamento 500 e 300 mg. No experimento 3, a suplementação com betacaroteno reduziu a incidência de retenção de placenta (8 % vs. 26%).

Chew et al. (1982b) relacionaram a severidade da mastite com o teor plasmático de betacaroteno em 45 vacas leiteiras. A severidade da mastite foi categorizada pelo teste californiano (CMT). Amostras de sangue foram coletadas a cada CMT realizado. Foi observado decréscimo no teor plasmático de betacaroteno quanto maior foi a severidade da mastite, foi 4,7 µg/mL para o escore 1 do CMT, 4,5 µg/mL para o escore 2 e 3,7 µg/mL para o escore 3.

Entretanto, Johnston e Chew (1984) observaram relação inversa entre o teor plasmático de betacaroteno 10 dias antes até sete dias após o parto e a incidência de mastite em 96 vacas leiteiras no início da lactação. Outros estudos não apontaram efeito benéfico da suplementação de betacaroteno em reduzir a CCS e prevenir mastite (BINDAS et al., 1984; KAEWLAMUN et al., 2012; LEBLANC et al., 2004; OLDHAM et al., 1991).

2.12.3 Ação no útero

Akar e Gazioglu (2006) relataram menor teor de betacaroteno plasmático no início da lactação em vacas que desenvolveram RP. O teor plasmático de betacaroteno nas vacas com RP nos dias 14, 21, 28, 35 e 42 da lactação foi 1,12, 1,31, 1,48, 1,62 e 1,93 µg/mL, respectivamente. Nos animais sem RP os teores foram 1,41, 2,44, 3,44, 5,09 e 5,46 µg/mL. Houve diferença estatística em todos os dias coletados. Inaba et al. (1986a) também observaram que vacas com maior teor plasmático de betacaroteno no dia do parto e no primeiro dia pós-parto tiveram menor incidência de RP.

Michal et al. (1994) alocaram 56 vacas Holandesas a quatro tratamentos: 1) não suplementado (controle); 2) 300 mg de betacaroteno/d (T300); 3) 600 mg de betacaroteno/d (T600) ou; 4) 120.000 UI de palmitato de retinol/d (VitA). O betacaroteno (Rovimix) e o palmitato de retinol foram acrescidos à dieta dos animais de 30 dias antes (D-30) até 30 dias após o parto (D30). Leucócitos foram isolados do sangue e do leite das vacas. Os neutrófilos foram incubados com *Staphylococcus aureus* e os linfócitos foram incubados e tiveram a proliferação induzida por agentes mitogênicos. Antes da suplementação as vacas tiveram teores subótimos de betacaroteno plasmático (2,3 µg/mL) e ótimos de vitamina A (0,42 µg/mL). Os teores plasmáticos de vitamina A e betacaroteno diminuíram até o D7 em todos tratamentos. O T600 retardou o decréscimo no teor plasmático de betacaroteno e teve teor no D30 similar ao D-30 (2,3 µg/mL). Não houve diferença entre o T300 e o tratamento controle e ambos foram superiores ao VitA em relação aos teores plasmáticos de betacaroteno. Houve queda na taxa de retenção de placenta do T600 em relação ao controle (25 vs. 41%) e tendência de queda do VitA e T300 comparados ao controle (33 e 31 vs. 41%). Apesar desta resposta, apenas os tratamentos suplementados com betacaroteno apresentaram aumento na proliferação induzida de linfócitos (T600) e no índice fagocítico dos neutrófilos incubados com *Staphylococcus aureus* (T300).

Kaewlamun et al. (2011b) suplementaram 20 vacas leiteiras com 1000 mg de betacaroteno/d (Rovimix. DSM Nutritional Products Ltd., Paris, França), 60 dias antes do parto (D-60) até o parto (D0). Outras 20 vacas foram utilizadas como controle. O teor plasmático de betacaroteno antes da suplementação foi 3,0 µg/mL. A suplementação elevou o teor plasmático de betacaroteno para 7,5 µg/mL no dia 30 pré-parto (D-30), entretanto houve queda drástica nos teores plasmáticos de betacaroteno do D-14 (7,0 µg/mL) até o D14 (3,0 µg/mL). No tratamento controle houve queda nos teores plasmáticos de betacaroteno do D-

60 até o D14 (2,3 µg/mL). A diferença nos teores plasmáticos entre as vacas suplementadas e controle perderam significância a partir do D14. Foi detectado aumento no teor plasmático de hidroxiprolina (aminoácido relacionado a degradação do colágeno) no D21. Além disso, houve redução na porcentagem de neutrófilos em esfregaços cervicais e uterinos das vacas suplementadas comparadas ao controle no D28, indicando melhor involução uterina nas vacas suplementadas com betacaroteno.

Wang et al. (2013) suplementaram 316 vacas com 5 g de betacaroteno (Rovimix. *DSM Nutritional Products Ltd.*, Parsippany, Estados Unidos), via infusão oral, nos dias -23, -12 e 0 (relativos ao parto). Foi detectada menor incidência de metrite puerperal e febre no início da lactação em vacas multíparas que tiveram retenção de placenta e que foram suplementadas com betacaroteno comparadas ao controle.

Veličković et al. (2008) administraram, por via i.m., 200 mg de betacaroteno ou solução salina a 30 vacas Holandesas, duas semanas antes e duas semanas após o parto. Não foi observada resposta do betacaroteno na incidência de retenção de placenta comparado a solução salina.

2.12.4 Ação no balanço energético

Foi demonstrado que dietas com alta energia, em camundongos, estimulam a expressão do gene (MCP-1) responsável pela quimioatração de macrófagos no tecido adiposo e camundongos com infiltração macrofágica neste tecido apresentaram resistência à insulina (KANDA et al., 2006). Foi sugerido que a produção de ERO pelos macrófagos seria um dos fatores que induziria a resistência à insulina (KAMEJI et al., 2010) e assim, esses autores incubaram células adiposas na presença do fator de necrose tumoral alfa (um potente gerador de ERO) com betacaroteno nas concentrações 0, 10 ou 20 µM. Células

adiposas, incubadas com 20 μ M de betacaroteno, apresentaram redução na concentração de ERO e aumento na expressão de vários genes relacionados a sensibilidade à insulina, incluindo os que expressam as adiponectinas e os transportadores de glicose (glut-4).

Vacas podem apresentar resistência à insulina durante a transição do final da gestação à lactação (DRACKLEY, 1999). Entretanto, não foi detectada relação entre o teor plasmático de betacaroteno e o estado energético de vacas leiteiras (KAEWLAMUN et al., 2012; KAWASHIMA et al., 2010; SHAW et al., 1950). Kawashima et al. (2010) não observaram diferenças significativas nos perfis metabólicos de glicose e de ácido graxo não esterificado no início da lactação de vacas suplementadas ou não com betacaroteno durante 21 dias antes do parto. Kaewlamun et al. (2012) também não detectaram diferença no teor de ácidos graxos não esterificados no início da lactação de vacas suplementadas ou não com 1000 mg de betacaroteno (Rovimix. *DSM Nutritional Products Ltd.*, Paris, França) durante 60 dias antes do parto. Shaw et al. (1950) não encontraram relação entre o teor plasmático de betacaroteno ou vitamina A no pré-parto de vacas leiteiras e cetose no início da lactação.

2.12.5 Ação em tumores

Em camundongos, a suplementação de betacaroteno protegeu contra câncer de pele induzido pela radiação ultravioleta e também contra tumores induzidos quimicamente (BENDICH, 1989). O carcinoma de células escamosas oculares é a neoplasia com maior frequência em bovinos, sendo que a incidência de raios ultravioletas é um dos principais fatores que predispõem a doença (MOULTON et al., 1978).

2.12.6 Mecanismos de atuação

Os mecanismos pelos quais os carotenoides regulam a imunidade não estão completamente compreendidos. Foi citado que os carotenoides melhoram a função imune através da habilidade de regular a fluidez das membranas, de melhorar a comunicação da junção do tipo gap e também como antioxidante (CHEW; PARK, 2004). O efeito antioxidante é o mecanismo mais amplamente aceito. As células imunes podem sofrer dano por espécies reativas de oxigênio produzidas durante o processo de eliminação dos patógenos. (BENDICH, 1989; CHEW, 1993).

2.13 Ação do betacaroteno na produção de leite

Oldham et al. (1991) suplementaram 41 vacas leiteiras com 300 mg/d de betacaroteno + 50.000 UI de vitamina A/d durante 76 dias antes do parto até 42 dias da lactação. Outras 41 vacas foram utilizadas como controle recebendo 50.000 UI de vitamina A/d. Houve tendência de aumento em produção de leite das vacas suplementadas com betacaroteno comparadas ao controle (38,1 vs. 35,8 kg/d).

Aréchiga et al. (1998) suplementaram 114 vacas leiteiras multíparas com 400 mg/d de betacaroteno (Rovimix. *Hoffmann-La Roche Inc.*, Nutley, Estados Unidos) durante os dias 15 ao 170 pós-parto. Outras 114 vacas foram utilizadas como controle. Foi observado aumento na produção de leite das vacas suplementadas comparadas ao controle (8106 vs. 7577 kg).

De Ondarza et al. (2009) suplementaram 266 vacas leiteiras com 425 mg/d de betacaroteno (Rovimix. *DSM Nutritional Products Ltd.*, Parsippani, Estados Unidos) por 120 dias após o parto. Outras 249 vacas foram utilizadas como controle. A dieta basal continha 8.400 UI de vitamina A/kg na MS. Foi observado aumento no teor e produção de proteína no leite, embora estes efeitos

só tenham sido observados em vacas até 100 dias em lactação (2,96% vs. 2,92%, $P=0,11$) e em vacas com mais de três partos (1,32 vs. 1,27 kg, $P=0,13$). Entretanto, o efeito mais marcante foi o aumento na produção de gordura do leite (1,45 vs. 1,36 kg/d, $P=0,02$). O aumento da secreção de gordura no leite pode ser explicado pelo aumento, *in vitro*, no crescimento de bactérias celulolíticas em fluidos ruminais incubados com betacaroteno (HINO et al., 1993). Outros autores não observaram efeito na produção e composição de leite em resposta à suplementação de betacaroteno em vacas leiteiras (BINDAS et al., 1984; KAEWLAMUN et al., 2012; RAKES et al., 1985; WANG; OWEN; LARSON, 1988).

2.14 Ação do betacaroteno na reprodução

2.14.1 Atividade esteroideogênica

Kawashima et al. (2009) relacionaram o teor plasmático de betacaroteno antes do parto com o retorno da atividade lútea no pós-parto de 22 vacas leiteiras multíparas. As vacas que ovularam durante a primeira onda folicular pós-parto tiveram maior teor plasmático de betacaroteno 21 dias antes do parto em comparação às vacas que não ovularam (2,97 vs. 1,53 $\mu\text{g/mL}$).

Vários fatores têm sido associados ao desenvolvimento dos cistos foliculares, incluindo a alta produção de leite, o balanço energético negativo, complicações no parto, predisposição genética e desordens nutricionais (Opsomer et al., 1999). O mecanismo da formação dos cistos foliculares parece envolver a insensibilização do hipotálamo ao estrógeno durante o crescimento folicular, induzida previamente por uma baixa exposição do hipotálamo à progesterona (GUMEN; WILTBANK, 2002, 2005). Inaba et al. (1986) observaram que o teor plasmático de betacaroteno foi significativamente menor

em vacas com cistos foliculares que em vacas sem cistos (1,1 vs. 3,3 µg/mL) no início da lactação. O aumento da produção de progesterona induzido pelo betacaroteno poderia estar associado a este fato (ARIKAN; RODWAY, 2000; RAPOPORT et al., 1998; TALAVERA; CHEW, 1988).

Rapoport et al. (1998) coletaram corpos lúteos de bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento e correlacionaram a capacidade esteroidogênica com os teores de betacaroteno nessas células. Foi observada correlação positiva ($r=0,43$) e significativa entre o teor celular de betacaroteno e o teor de progesterona plasmática.

Alguns autores demonstraram que a adição de betacaroteno poderia aumentar a produção de progesterona em células luteais *in vitro* (ARIKAN; RODWAY, 2000; TALAVERA; CHEW, 1988). Talavera e Chew (1988) incubaram células luteais de suínos com diferentes concentrações de ácido retinoico, betacaroteno e retinol. Ao desafiar estas células com hormônio luteinizante, foi observado aumento linear na produção de progesterona ao utilizar ácido retinoico e retinol em concentrações crescentes. Apesar do meio com betacaroteno em sua menor concentração (0,1 µmol/L) ter apresentado os melhores resultados entre todos os compostos, os meios mais concentrados (1 µmol/L e 10 µmol/L) reduziram linearmente a produção de progesterona. Arikan e Rodway (2000) observaram efeito positivo da adição de betacaroteno na concentração 0,1µmol/L sobre a produção de progesterona de células luteais bovinas *in vitro*. Entretanto, alto teor de betacaroteno (1µmol/L) inibiu a produção de progesterona. Vale ressaltar que estes experimentos não diferenciaram o efeito direto do betacaroteno no aumento da síntese da progesterona do seu papel como provitamina A, já que o betacaroteno pode ser convertido em retinol em células luteais (MORALES et al., 2006).

Foi sugerido que a vitamina A poderia estimular a síntese e a ativação da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CSCCE) nas células luteais,

enzima responsável por um dos passos da produção de progesterona (GANGULY et al., 1980). Mais tarde, foi comprovado que os retinoides estão relacionados com a ativação de alguns genes relacionados a esteroidogênese, como o CYP11A1 responsável pela codificação da enzima CSCCE (WICKENHEISSER et al., 2005). Outro mecanismo sugerido ao betacaroteno em relação à esteroidogênese é o de proteção das células e componentes ovarianos contra as espécies reativas de oxigênio (WENG et al., 2000; CHEW et al., 2001; TALAVERA; CHEW, 1988). Young et al. (1985) observaram que células luteais cultivadas *in vitro* com betacaroteno apresentaram menor concentração de ligações cruzadas entre a enzima CSCCE e radicais livres produzidos no processo de conversão do colesterol a progesterona. Estas ligações cruzadas inativam as enzimas CSCCE, limitando assim a produção de progesterona.

2.14.2 Efeito da suplementação de betacaroteno no útero e na produção de embriões

Sales et al. (2008) estudaram a resposta superovulatória e a qualidade de embriões em novilhas e vacas Holandesas em lactação suplementadas com duas doses de betacaroteno associadas ao tocoferol. Os autores superovularam 87 novilhas e 90 vacas. No dia 0 e 5 do protocolo de superovulação, os animais receberam a suplementação de betacaroteno (BC) e tocoferol (T) por via intramuscular, formando três tratamentos. O primeiro tratamento recebeu 800 mg de BC + 500 mg de T, o segundo recebeu 1.200 mg de BC e 750 mg de T e o terceiro foi utilizado como controle. Não houve efeito da suplementação sobre a proporção e a quantidade de embriões viáveis. Entretanto, houve interação entre tratamento e paridade para estas duas variáveis. Foi observado ganho na viabilidade de embriões nas vacas suplementadas, mas ocorreu efeito inverso nas

novilhas. Wang et al. (2002), ao administrar, *in vitro*, altas doses de tocoferol em embriões de camundongos, verificaram redução no desenvolvimento e morte destes embriões. Efeito negativo da suplementação de antioxidantes, como já visto, pode acontecer por inversão de papéis destes compostos, tornando pró-oxidantes quando há um desequilíbrio na relação entre os antioxidantes do corpo (BOUWSTRA et al., 2010).

Schweigert et al. (2002) estudaram o efeito da vitamina A e do betacaroteno dietético no desenvolvimento e na qualidade embrionária de 36 marrãs alocadas a três tratamentos: 1) 4.000 UI de vitamina A/marrã/d; 2) 8.300 UI de vitamina A/marrã/d; 3) 100 mg de betacaroteno/marrã/d e 4.000 UI de vitamina A/marrã/d. Previamente essas marrãs passaram por dieta de depleção de betacaroteno por quatro semanas. Foi detectada maior proporção de blastocistos e maior qualidade embrionária no tratamento com betacaroteno em relação aos demais tratamentos, sugerindo melhor desenvolvimento embrionário.

Alguns trabalhos sugerem que o betacaroteno pode regular o fluido uterino. Marrãs suplementadas com betacaroteno tiveram maior quantidade de proteína de ligação do retinol (RBP) no dia 15 da gestação comparadas ao tratamento controle com adequada suplementação de vitamina A (CHEW et al., 1982a). Outros trabalhos observaram resultados semelhantes no fluido uterino de gatas (CHEW et al., 2001) e de marrãs (SCHWEIGERT et al., 2002), também adotando tratamentos controle adequados em vitamina A. Weng et al. (2000) não observaram efeito sobre a concentração total de proteína no fluido uterino de cadelas suplementadas com doses crescentes de betacaroteno. Entretanto, cadelas suplementadas com 50 mg de betacaroteno tiveram maior teor plasmático de progesterona no dia 12 e 26 da gestação comparativamente ao controle. A implantação do embrião depende da comunicação cruzada entre o blastocisto e o endométrio, sendo que este mecanismo depende da vitamina A e do teor de RBP no meio uterino (SCHWEIGERT et al., 2002). Além disso, a

placentação e o desenvolvimento embrionário também são determinados pela vitamina A (CLAGETT-DAME; DELUCA, 2002).

Outro mecanismo sugerido ao betacaroteno em relação à fertilidade é o de proteção das células uterinas e embrionárias contra a peroxidação, facilitando a implantação e sobrevivência do embrião (CHEW et al., 2001; SCHWEIGERT et al., 2002). Ikeda et al. (2005) citaram que é possível que o betacaroteno extracelular no fluido folicular e o betacaroteno intracelular incorporado em células foliculares e nos oócitos, os protegem contra a citotoxicidade mediada pelas espécies reativas de oxigênio, podendo aumentar o desenvolvimento dos oócitos competentes.

Aréchiga, Ealy e Hansen (1995) demonstraram que alta temperatura durante o desenvolvimento de embriões aumenta a produção de radicais livres consumindo antioxidantes solúveis. Neste estudo, a exposição de embriões de camundongos a choque térmico severo (41°C) prejudicou o desenvolvimento e a viabilidade destes embriões. Um dos mecanismos para explicar o efeito deletério da temperatura elevada sobre os embriões foi a diminuição em quase 50% na concentração intracelular de glutatona (um antioxidante natural). A inibição da síntese de glutatona, pela adição do composto butionina sulfoximina, também reduziu a viabilidade e o desenvolvimento dos embriões.

Retinol não tem a capacidade de suprimir moléculas de oxigênio singlete e tem uma capacidade muito baixa de reduzir outras espécies reativas de oxigênio (COMBS JR, 2012). Portanto, pode-se presumir um efeito particular do betacaroteno na fertilidade bovina em relação à vitamina A.

2.14.3 Suplementação de vacas em lactação com betacaroteno

Rakes et al. (1985) encontraram menor diâmetro da cérvix de vacas (n=35) suplementadas com 300 mg/d de betacaroteno nos 21 e 28 dias pós-parto

comparado às vacas não suplementadas com betacaroteno (n=35). Vacas suplementadas com betacaroteno também foram mais precoces em retornar a ciclicidade estral. As vacas foram suplementadas com betacaroteno do parto até 100 dias em lactação. Não houve diferença entre os tratamentos no teor plasmático de betacaroteno ao parto (2,6 µg/mL). A suplementação elevou o teor plasmático de betacaroteno até o dia 75 (3,0 µg/mL), a partir do qual houve estabilização. As vacas não suplementadas tiveram queda do teor plasmático até o dia 25 (1,6 µg/mL) e elevação até o dia 75 (2,4 µg/mL), estabilizando em seguida.

Aréchiga et al. (1998) realizaram três experimentos utilizando 701 vacas leiteiras. Os experimentos 1 e 2 foram realizados no verão e o experimento 3 no inverno. Metade das vacas em cada experimento foi suplementada com 400 mg de betacaroteno/d (Rovimix. Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, Estados Unidos) durante os dias 15 a 170 da lactação, a outra metade foi utilizada como controle. No experimento 1 as vacas suplementadas com betacaroteno apresentaram teores plasmáticos de betacaroteno superiores às do controle (6 vs. 3 µg/mL, aos 90 dias da lactação). Nos experimentos 2 e 3 houve aumento discreto no teor plasmático de betacaroteno em resposta à suplementação (3,5 vs. 3 µg/mL e 2,5 vs. 2 µg/mL, aos 90 dias da lactação). Apenas no experimento 1 houve efeito positivo da suplementação sobre a fertilidade. Vacas suplementadas com betacaroteno por mais de 90 dias tiveram maior taxa de prenhez aos 120 dias em relação ao controle (35,4 vs. 21,1%). Os autores sugeriram que a condição de estresse térmico no experimento 1 pode ter induzido a resposta favorável no desempenho reprodutivo à suplementação, já que a temperatura corporal está relacionada ao estresse oxidativo dos animais (BERNABUCCI et al., 2002).

De Ondarza et al. (2009) suplementaram 266 vacas leiteiras com 425 mg/d de betacaroteno (Rovimix. *DSM Nutritional Products Ltd.*, Parsippani, Estados Unidos) por 120 dias após o parto. Outras 249 vacas foram utilizadas

como controle. A dieta basal continha 8.400 UI de vitamina A/kg na MS. Sessenta dias após o parto, o teor plasmático de betacaroteno foi $2,47 \pm 0,98$ $\mu\text{g/mL}$ para o tratamento controle e $3,56 \pm 1,93$ $\mu\text{g/mL}$ para o tratamento suplementado. No dia 120, o teor plasmático de betacaroteno foi $1,71 \pm 0,55$ $\mu\text{g/mL}$ e $2,75 \pm 1,34$ $\mu\text{g/mL}$ para controle e suplementado, respectivamente. A proporção de vacas gestantes calculadas a cada 21 dias foi 23% nas vacas suplementadas e 12% no tratamento controle. No dia 126 o efeito benéfico continuou, foi 20% e 9% para suplementadas e controle, respectivamente.

Ay et al. (2012) avaliaram o efeito da administração intramuscular com 0,4 mg/kg de peso vivo de betacaroteno (Carofertin. *Alvetra&Werfft AG*, Neufeld an der Leitha, Áustria) sobre parâmetros reprodutivos de vacas em lactação. Um total de 124 vacas Holandesas foram alocadas a cinco tratamentos: T1) administração de betacaroteno nos dias 15 e 45 após o parto (pp); T2) administração de betacaroteno apenas no dia 15 pp; T3) administração de betacaroteno apenas no dia 45 pp; T4) administração de betacaroteno nos dias 35 e 45 pp; T5) controle. O teor plasmático de betacaroteno no dia 15 pp foi semelhante entre os tratamentos (1,0 $\mu\text{g/mL}$). No dia 48, o teor plasmático de betacaroteno foi 3,5 $\mu\text{g/mL}$ no T1, 1,9 $\mu\text{g/mL}$ no T2, 4,1 $\mu\text{g/mL}$ no T3, 4,4 $\mu\text{g/mL}$ no T4 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ no controle. Houve aumento no teor plasmático de betacaroteno entre os dias 15 e 48 para todos os tratamentos, exceto para o controle. A proporção de vacas gestantes após três inseminações foi 100% no T1 e 88% no T4, superior aos valores de 80% no T2, 84% no T3 e 70,8% no controle. O Teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar a proporção de vacas gestantes.

Entretanto, vários autores relataram a falta de efeito significativo da suplementação com betacaroteno após o parto sobre o desempenho reprodutivo. Akordor et al. (1986) não detectaram efeito sobre a taxa de concepção ao primeiro serviço e a involução uterina da suplementação de 400 mg/d de

betacaroteno (Rovimix. *Hoffman-La Roche Ltd.*, Brampton, Canadá) do dia 10 pós-parto até as vacas ficarem gestantes ou serem descartadas. O teor plasmático de betacaroteno foi menor ao parto (1,0 µg/mL) que 40 dias antes do parto (4,0 µg/mL). A suplementação elevou o teor plasmático de betacaroteno no dia 98 pós-parto a 2 µg/mL, a partir do qual houve estabilização. No tratamento controle, o teor plasmático de betacaroteno declinou até o dia 100 pós-parto (0,6 µg/mL).

Bindas et al. (1984) também relataram que a suplementação de vacas leiteiras com 600 mg/d de betacaroteno (Rovimix. *Hoffmann-La Roche and Co. Ltd.*, Basel, Suíça), da quarta semana após o parto até a semana 13, não afetou o intervalo em dias do parto ao primeiro serviço e o número de serviços por concepção. Além disso a suplementação não teve efeito sobre os teores de LH, progesterona, insulina e glucagon no plasma. A dieta basal continha silagem de milho e adequada suplementação de vitamina A com 65.000 UI/d. O teor plasmático de betacaroteno na primeira semana pós-parto foi baixo (0,8 µg/mL). A suplementação elevou o teor plasmático de betacaroteno até a semana nove da lactação para 2,45 µg/mL. As vacas no tratamento controle tiveram teor plasmático de betacaroteno de 1,5 µg/mL na semana sete da lactação, estabilizando em seguida.

Wang, Hafi e Larson (1988) avaliaram o efeito da suplementação de 600 mg/d betacaroteno por 27 semanas sobre a liberação de LH pelo hipotálamo em resposta a desafio com GnRH em vacas leiteiras. As vacas lactantes no tratamento controle (n=7) e no suplementado (n=6) tiveram teor plasmático de betacaroteno de 2,6 µg/mL no início do período experimental. A suplementação elevou o teor plasmático de betacaroteno para 3,5 µg/mL na 16ª semana. No tratamento controle, o teor plasmático de betacaroteno declinou a 1,9 µg/mL na semana 16. Após esta fase, os autores interromperam a lactação das vacas, porém a suplementação foi mantida. Na semana 28, o teor plasmático de

betacaroteno declinou para 1,5 µg/mL nos animais suplementados e para 1,0 µg/mL no controle. Os autores não conseguiram explicar a queda no teor plasmático de betacaroteno com o encerramento da lactação. As vacas foram ovariectomizadas na semana 20 e o desafio de GnRH foi realizado na semana 27. Não foi detectado efeito de tratamento sobre o teor plasmático basal de LH, sobre a frequência e amplitude dos pulsos de LH intervalados a cada 15min durante 6h, ou sobre a quantidade total de LH liberado estimado da área sob a curva de LH, em resposta à administração de GnRH. Também não foi detectado efeito sobre o teor plasmático de progesterona, tamanho do corpo lúteo e teor de progesterona luteal imediatamente antes da ovariectomização.

2.14.4 Suplementação de betacaroteno no pré-parto de vacas leiteiras

Bian et al. (2007) avaliaram o efeito da suplementação de betacaroteno durante o pré e pós-parto sobre o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras em três experimentos. Nos experimentos 1 e 2, 75 vacas foram suplementadas com 0, 300 ou 500 mg/d de betacaroteno. No experimento 3, 76 vacas foram suplementadas com 0 ou 300 mg/d. A suplementação começou três semanas antes do parto até 10 semanas após. No experimento 1 as vacas suplementadas com betacaroteno (300 e 500 mg) tiveram maior teor plasmático de betacaroteno em relação ao controle nos dias 10 (0,9 vs. 0,5 µg/mL) e 60 após o parto (1,2 vs. 0,4 µg/mL), porém não apresentaram diferenças entre si. No experimento 2 foi detectada diferença no teor plasmático de betacaroteno apenas no dia 60 após o parto, o tratamento suplementado com 500 mg apresentou o maior teor plasmático (3,3 µg/mL), os tratamentos 0 e 300 mg não diferiram entre si (2,5 µg/mL). Houve redução nos dias do parto ao primeiro estro do tratamento 500 mg em relação aos tratamentos 300 mg e controle, que não diferiram entre si, no experimento 1 (72, 84 e 80 dias, respectivamente) e experimento 2 (71, 76 e 79

dias, respectivamente). No experimento 3 a suplementação de 300 mg de betacaroteno aumentou a porcentagem de vacas com presença de corpo lúteo (58 vs. 39%) e a taxa de prenhez (36 vs. 24%) no dia 70 após o parto comparado ao controle.

Kawashima et al. (2010) estudaram o efeito da suplementação de betacaroteno antes do parto sobre o retorno da ciclicidade estral em vacas leiteiras após o parto. Dois experimentos foram realizados. No experimento 1 as vacas foram suplementadas com 0 ou 500 mg de betacaroteno por $24,6 \pm 2,6$ d antes do parto. No experimento 2 as vacas foram suplementadas com 0 ou 2.000 mg de betacaroteno por $24,3 \pm 1,5$ d antes do parto. A suplementação com betacaroteno aumentou a proporção de vacas que ovularam na primeira onda folicular pós-parto: 4/5 vs. 1/5 no experimento 1 e 9/12 vs. 5/10 no experimento 2.

Kaewlamun et al. (2011b) suplementaram 20 vacas leiteiras com 1.000 mg de betacaroteno/d (Rovimix. *DSM Nutritional Products Ltd.*, Paris, França) de 60 dias antes do parto (D-60) até o parto (D0). Outras 20 vacas foram utilizadas como controle. O teor plasmático de betacaroteno antes da suplementação foi $3,0 \mu\text{g/mL}$. A suplementação elevou o teor plasmático de betacaroteno para $7,5 \mu\text{g/mL}$ no dia 30 pré-parto (D-30), entretanto houve queda do D-14 ($7,0 \mu\text{g/mL}$) até o D14 ($3,0 \mu\text{g/mL}$). No tratamento controle, houve queda no teor plasmático de betacaroteno do D-60 até o D14 ($2,3 \mu\text{g/mL}$). Não houve diferença entre tratamentos no teor plasmático de betacaroteno no D14. Não foi detectado efeito da suplementação pré-parto com betacaroteno sobre o intervalo do parto à primeira ovulação, na produção total de progesterona estimada pela área sob a curva de progesterona diária do leite e na atividade ovariana estimada pelas concentrações de progesterona do leite no período de 0 a 50d e 51 até o fim do experimento, classificada como ciclo normal, anovulação, ciclo irregular ou corpo lúteo persistente.

Veličković et al. (2008) injetaram por via intramuscular 200 mg de betacaroteno em 15 vacas Holandesas, duas semanas antes e duas semanas após o parto. Não foi detectado efeito sobre variáveis reprodutivas comparativamente ao controle não injetado. As variáveis estudadas foram: dias do parto ao primeiro estro, número de serviços por concepção e dias do parto à concepção.

Wang et al. (2013) suplementaram 316 vacas com 5 g/d de betacaroteno (Rovimix. DSM, Nutritional Products Ltd., Parsippany, Estados Unidos) nos dias -23, -12 e 0 relativamente ao parto. Não foi detectado efeito da suplementação com betacaroteno sobre a reprodução. As variáveis estudadas foram: proporção de vacas com presença de corpo lúteo no dia 63, taxa de concepção após 60 dias da 1ª e 2ª IA e proporção de vacas gestantes aos 300 dias de lactação.

O efeito negativo da suplementação com betacaroteno sobre a fertilidade de vacas leiteiras foi relatado (FOLMAN et al., 1987). Estes autores alocaram 155 vacas a três tratamentos. No tratamento 1 (VA-VA) as vacas foram suplementadas por 60 dias antes do parto (D-60), com 69 mg de acetato de retinil/d e após o parto receberam 96 mg de acetato de retinil. Tratamento 2 (BC-VA), as vacas foram suplementadas com 500 mg de betacaroteno (Rovimix. Hoffmann-La Roche, Basel, Suíça) no pré-parto e 96 mg de acetato de retinil no pós-parto. Tratamento 3 (BC-BC), as vacas foram suplementadas com 500 mg de betacaroteno no pré-parto e 700 mg de betacaroteno no pós-parto. Os suplementos foram fornecidos até as vacas gestarem ou serem descartadas. Os teores plasmáticos de betacaroteno nos D-35 e D-14 (antes do parto) e nos D30, D60 e D90 (após o parto) foram: 2,36, 1,76, 0,82, 1,00 e 1,06 µg/mL para VA-VA, 5,51, 5,13, 1,44, 1,39 e 1,43 µg/mL para BC-VA e 5,56, 5,56, 4,30, 5,81 e 6,57 µg/mL para BC-BC. A taxa de concepção para todas as inseminações foi 53,9% para VA-VA), 42,2% para BC-VA e 27,9 % para BC-BC. O intervalo do parto à concepção para vacas com três partos ou menos ($\leq 3P$) e para vacas com

quatro partos ou mais ($\geq 4P$) foram, respectivamente, 110 e 112 dias para VA-VA, 130 e 129 dias para BC-VA e 133 e 166 dias para BC-BC. O número de inseminações por concepção para vacas $\leq 3P$ e $\geq 4P$ foram de 1,8 e 1,8 para VA-VA, 2,2 e 2,2 para BC-VA e 2,5 e 3,4 para BC-BC. O teor plasmático de betacaroteno no tratamento BC-BC foi superior ao ótimo de 3,0 $\mu\text{g/mL}$ (FRYE; WILLIAMS; GRAHAM, 1991). Os autores não sugeriram algum mecanismo para a resposta negativa em desempenho reprodutivo à suplementação com betacaroteno.

2.14.5 Mecanismos de atuação

O mecanismo de ação pelo qual a suplementação com betacaroteno pode determinar a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras parece envolver sua conversão em vitamina A no útero e ovários, já que a vitamina A está relacionada com a implantação e o desenvolvimento embrionário e também está envolvida na expressão gênica de enzimas relacionadas a esteroidogênese nos ovários. O betacaroteno também pode ter ação antioxidante, protegendo componentes celulares de espécies reativas de oxigênio, o que pode aumentar a função imune e a sobrevivência dos embriões. Entretanto, o betacaroteno não parece atuar a nível do sistema hipotálamo-hipofisário. Além disso, a resposta à suplementação com betacaroteno pode ser determinada pela duração do período de suplementação, pelo teor de betacaroteno na dieta basal e pelo teor sanguíneo obtido. O desafio ambiental também determina a resposta do animal ao betacaroteno suplementar.

2.15 Discussão comparativa entre os principais trabalhos da literatura

O teor plasmático de betacaroteno em vacas no início da lactação (11 ± 12 d) foi $2,48 \pm 1,60 \mu\text{g/mL}$ e a suplementação média de $454 \pm 121 \text{ mg/vaca/d}$ de betacaroteno elevou os teores plasmáticos de betacaroteno em $0,74 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ após 60 dias de tratamento (Tabela 1). Não foram observadas respostas em desempenho reprodutivo em experimentos cuja suplementação de betacaroteno elevou de forma discreta o teor plasmático de betacaroteno (AKORDOR et al., 1986; BINDAS et al., 1984). Foi detectado um acréscimo na proporção de vacas gestantes em vacas suplementadas com betacaroteno por mais de 90 dias (ARÉCHIGA et al., 1988) e por mais de 105 dias (DE ONDARZA et al., 2008) e nas quais os teores plasmáticos de betacaroteno após a suplementação alcançaram níveis superiores a $3,0 \mu\text{g/mL}$. Entretanto, Folman et al. (1987) observaram um efeito negativo em desempenho reprodutivo de vacas leiteiras suplementadas com betacaroteno 60 dias antes do parto até se tornarem gestantes (Tabela 2). Neste experimento o teor plasmático obtido após a suplementação foi maior que $6,0 \mu\text{g/mL}$. Mensurar a capacidade antioxidante das vacas antes da suplementação e acompanhar o estado oxidativo em resposta à suplementação podem ser parâmetros importantes ao suplementar antioxidantes (BOUWSTRA et al., 2010). Estes dados poderiam ajudar a explicar a magnitude e a direção das respostas ao uso de betacaroteno encontradas na literatura.

Diminuição na incidência de retenção de placenta (BIAN et al., 2007; MICHAL et al., 1994) e melhora na involução (KAEWLAMUN et al., 2011b) e saúde uterina (WANG et al., 2013) foram observadas principalmente ao suplementar betacaroteno começando no pré-parto de vacas leiteiras (Tabelas 2 e 3). Sendo que a suplementação apenas no pré-parto de vacas leiteiras (Tabela 3) pareceu influenciar eventos restritos ao período em torno do parto (KAEWLAMUN et al., 2011b; WANG et al., 2013), já que a resposta no teor plasmático de betacaroteno à suplementação de betacaroteno diminuiu com o

avançar dos dias em lactação (KAEWLAMUN et al., 2011b). Betacaroteno reduziu a contagem de células somáticas (RAKES et al., 1985) e diminuiu a incidência de mastite (BIAN et al., 2007; WANG et al., 2013). Entretanto, diversos autores não encontraram efeito na saúde da glândula mamária (DE ONDARZA et al., 2008; BINDAS et al., 1984; OLDHAM et al., 1991; KAEWLAMUN et al., 2012). Variáveis reprodutivas e de saúde não são dependentes apenas do teor plasmático de betacaroteno. Alguns fatores podem mascarar ou evidenciar a resposta à suplementação de betacaroteno e deveriam ser mais bem descritos nos experimentos como o uso de antibióticos, protocolos reprodutivos, ambientação e estresse oxidativo dos animais.

Tabela 1 Efeito da suplementação pós-parto de betacaroteno no teor plasmático e no desempenho produtivo, reprodutivo e de saúde em vacas leiteiras.

Estudo (N)	Supl. mg/d	TPBCP µg/mL	Período de supl. (DRP)	TPBCO (DAS) µg/mL	Produção de leite/mastite	Desordens Uterinas	Reprodução
Aréchiga et al. (1998) (N=228)	0 ou 400	3,0 vs. 5,0	15 à 170	2,7 vs. 6,7 (60 d) 3,0 vs. 6,0 (75 d)	Leite (kg) 7577 vs. 8106 kg	-	21,1 vs. 35,4% (P120) apenas após 90 dias de suplementação
Akordor et al. (1986) (N=56)	0 ou 400	1,0	10 à concepção	0,7 vs. 2,1 (60 d) 0,6 vs. 2,0 (100 d)	-	NS (metrite, involução uterina)	NS (cistos, parto ao 1º cio, P90 e P120)
Rakes et al. (1985) (N=70)	0 ou 300	2,6	0 à 100	2,0 vs. 2,6 (60 d) 2,4 vs. 3,0 (75 d)	< CCS NS (Leite)	< Diâmetro de Cérvix (+21 e +28d)	< Parto ao 1º cio
Wang et al. (1988) (N=13)	0 ou 600	2,6	0 à 196	1,6 vs. 2,4 (60 d) 1,9 vs. 3,5 (112 d)	-	-	NS (Progesterona, CL) NS (resposta do GnRH à liberação de LH)
De Ondarza et al. (2009) (N=515)	0 ou 425	< 3,0	0 à 120	2,5 vs. 3,6 (60 d) 1,7 vs. 2,7 (120 d)	NS (CCS) > Gordura	-	12 vs. 23% (P21, 105d) 9 vs. 20% (P21, 126d)
Bindas et al. (1984) (N=78)	0 ou 600	1,2	28 à 90	1,4 vs. 2,3 (60 d)	NS (CCS) NS (Leite)	-	NS (parto ao 1º cio, núm. IA por concepção)

N = Número de animais no experimento. Supl = suplementação. TPBCP = Teor plasmático de betacaroteno antes da suplementação. DRP = Dias relativos ao parto. TPBCO = Teor plasmático de betacaroteno obtido após a suplementação. DAS = Dias após a suplementação. P21 = Proporção de vacas gestantes a cada 21 dias. P90 e 120 = Proporção de vacas gestantes aos 90 e 120 dias em lactação.

Tabela 2 Efeito da suplementação pré e pós-parto de betacaroteno no teor plasmático e no desempenho produtivo, reprodutivo e de saúde em vacas leiteiras.

Estudo (N)	Supl. mg/d	TPBCP µg/mL	Período de supl. (DRP)	TPBCO µg/mL (DRP)	Produção de leite/mastite	Útero	Reprodução
Oldhan et al. (1991) (N=82)	0 ou 300	10,0	-75 até +42	6,0 vs. 8,5 (-28 d) 2,0 vs. 4,0 (+42 d)	NS (mastite) Leite (kg) 35,8 vs. 38,1	-	-
Michal et al. (1994) (N=56)	0, 300 ou 600	2,3	-30 até +30	1,1 vs. 1,1 vs. 2,3 (+30 d)	-	RP (41%, 31%, 25%)	-
Bian et al. (2007) 1ª Exp (N=75)	0, 300 ou 500	1,2	-21 até +70	0,4 vs. 1,0 vs. 1,2 (+60d)	Mastite 13,6% ^b , 0% ^a e 4,3% ^{ab}	NS (RP - 40%, 25%, 34%)	< Parto ao 1º cio (dias) 80a, 84a, 72b
Bian et al. (2007) 2ª Exp (N=75)	0, 300 ou 500	1,1	-21 até +70	2,5 vs. 2,5 vs. 3,3 (+60 d)	-	NS (RP - 27%, 19%, 18%)	< Parto ao 1º cio (dias) 79a, 76a, 71b
Bian et al. (2007) 3ª Exp (N=76)	0 ou 300	-	-21 até 70+	-	NS (Mastite - 36% vs. 19%)	< RP (26% vs. 8%)	> P70d (24 vs 36%)
Folman et al. (1987) (N=155)	0-0, 0-500 ou 500-700	-	-60 até concepção	1,8 vs. 5,1 vs. 5,6 (-14d). 1,1 vs.1,4 vs. 6,6 (-90d)	< Gordura (vacas ≥4 partos)	-	< CTIA (54, 42, 28%) Principalmente em vacas ≥4 partos

N = Número de animais no experimento. Supl = suplementação. TPBCP = Teor plasmático de betacaroteno antes da suplementação. DRP = Dias relativos ao parto. TPBCO = Teor plasmático de betacaroteno obtido após a suplementação. RP = Retenção de placenta. P70 = Proporção de vacas gestantes aos 70 dias em lactação. CTIA = Taxa de concepção após todas inseminações.

Tabela 3 Efeito da suplementação pré-parto de betacaroteno no teor plasmático e no desempenho produtivo, reprodutivo e de saúde em vacas leiteiras.

Estudo (N)	Supl. mg/d	TPBCP µg/mL	Período de supl. (DRP)	TPBCO (DRP) µg/mL	Produção de leite/mastite	Útero	Reprodução
Wang et al. (2013) (N=316)	0 ou 5000	-	-23, -12 e 0	-	Mastite (64,0 vs 53,9%) primíparas	< metrite (65,2 vs 31,0%) (Em vacas com RP)	NS (PCL-63d, P300d)
Kaewlamun et al. (2011; 2012) (N=40)	0 ou 1000	3,0	-60 até o parto	3,0 vs 7,5 (-30d) 2,3 vs 3,0 (+14d)	NS (CCS) NS (Leite)	> hidróxirolina (+21d)	NS (Progesterona no leite, parto ao 1º cio, atividade ovariana)

N = Número de animais no experimento. Supl = suplementação. TPBCP = Teor plasmático de betacaroteno antes da suplementação. DRP = Dias relativos ao parto. TPBCO = Teor plasmático de betacaroteno obtido após a suplementação. P300 = Proporção de vacas gestantes aos 300 dias em lactação. CTIA = Taxa de concepção após todas inseminações. PCL - 63d = Proporção de vacas com corpo lúteo aos 63 dias em lactação.

REFERÊNCIAS

AKAR, Y.; GAZIOGLU, A. Relationship between vitamin A and beta-carotene levels during the postpartum period and fertility parameters in cows with and without retained placenta. **Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy**, v. 50, n. 1, p. 93, Apr. 2006.

AKORDOR, F. Y. et al. Reproductive Performance of Lactating Holstein Cows Fed Supplemental β -Carotene. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 8, p. 2173-2178, Aug. 1986.

ANDERSON, R.; THERON, A. J. Physiological potential of ascorbate, β -carotene and α -tocopherol individually and in combination in the prevention of tissue damage, carcinogenesis and immune dysfunction mediated by phagocyte-derived reactive oxidants. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 62, p. 27-58, 1990.

ANDERSON, S. M.; KRINSKY, N. I. Protective action of carotenoid pigments against photodynamic damage to liposomes*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 18, n. 5, p. 403-408, Nov. 1973.

ARÉCHIGA, C. F.; EALY, A. D.; HANSEN, P. J. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 6, p. 1296-1301, June 1995.

ARÉCHIGA, C. F. et al. Effects of Timed Insemination and Supplemental β -Carotene on Reproduction and Milk Yield of Dairy Cows Under Heat Stress. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 390-402, Feb. 1998.

ARIAS, E. et al. β -Carotene is incorporated or mobilized along with

triglycerides in bovine adipose tissue in response to insulin or epinephrine. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 93, n. 1, p. 83-93, Feb. 2009.

ARIKAN, Ş.; RODWAY, R. G. Effect of cyclodextrin-encapsulated β -carotene on progesterone production by bovine luteal cells. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 3, p. 149-160, Dec. 2000.

ARTHINGTON, J. D.; BROWN, W. F. Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 7, p. 1726-1731, July 2005.

AY, S. S. et al. Beneficial effects of Beta-carotene injections prior to treatment with PGF 2a on the fertility of postpartum dairy cows. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 163, n. 8-9, p. 387-392. 2012

BASCHANT, U.; TUCKERMANN, J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 120, n. 2, p. 69-75, May. 2010.

BARUFFALDI, R.; VESSONI PENNA, T. C.; COLOMBO, A. J.; PITOMBO, R. Efeito do valor de pH do meio na estabilidade da peroxidase e de carotenos de cenoura (*Daucus carota* L.). **Anais de farmácia e química de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 52-56, 1981.

BELL, J. A.; GRIINARI, J. M.; KENNELLY, J. J. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 733-748, Feb. 2006.

BENDICH, A.; SHAPIRO, S. S. Effect of beta-carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat. **The Journal of Nutrition**, v. 116, n. 11, p. 2254-2262, June 1986.

BENZIE, I. F.F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, July 1996.

BERNABUCCI, U. et al. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2173-2179, Sept. 2002.

BERNABUCCI, U. et al. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2017-2026, June 2005.

BIAN, S. B. et al. The influence of beta-carotene supplementation on postpartum disease and subsequent reproductive performance of dairy cows in China. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 16, n. suppl. 2, p. 370-375, Sept. 2007.

BINDAS, E. M. et al. Reproductive and metabolic characteristics of dairy cattle supplemented with β -carotene. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 6, p. 1249-1255, June 1984.

BLOOD, D. C. et al. Medicina veterinária. **Nueva Editorial Interamericana**, 1988.

BOLING, J. A. et al. Secretion of Metabolites of Vitamin A and B-Carotene in the Bile of Sheep. **Journal of Animal Science**, v. 29, n. 3, p. 504-508, Sept. 1969.

BÖHM, Fritz et al. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 3, p. 621-622, July 1997.

BOREL, P. et al. Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. In: **ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE**. Marseille. Annales Marseille:INRA, p. 165-177, Apr. 2004.

BOUWSTRA, R. J. et al. Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part II: Oxidative stress following vitamin E supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5696-5706, Dec. 2010.

BRITTON, George. **The biochemistry of natural pigments**. Cambridge University Press, 1983.

BRUHN, J. C.; OLIVER, J. C. Effect of storage on tocopherol and carotene concentrations in alfalfa hay. **Journal of Dairy Science**, v. 61, n. 7, p. 980-982, July 1978.

BURKHARDT, H.; HARTMANN, F.; SCHWINGEL, M. L. Activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes by oxygen radicals. **Enzyme**, v. 36, n. 4, p. 221-231, 1985.

BURRI, B. J.; NEIDLINGER, T. R.; CLIFFORD, A. J. Serum carotenoid depletion follows first-order kinetics in healthy adult women fed naturally low carotenoid diets. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 8, p. 2096-2100, Aug. 2001.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 224, n. 4649, p. 569-573, May 1984.

BURTON, G. W. et al. β -Carotene autoxidation: oxygen copolymerization, non-vitamin A products, and immunological activity. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 305-316, Feb. 2014.

CAI, T. et al. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 7, p. 934-943, July 1994.

CARDINAULT, N. et al. Digestion and absorption of carotenoids in sheep given fresh red clover. **Animal Science-Glasgow then Penicuik**, v. 82, n. 1, p. 49, Feb. 2006.

CASTENMILLER, Jacqueline JM et al. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 2, p. 349-355, Feb. 1999.

CASTILLO, C. et al. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 2, p. 286-292, Mar. 2005.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, July 1979.

CHAUVEAU-DURIOT, B. et al. Carotenoids content in forages: variation during conservation. **Renc Rech Ruminants**, v. 12, p. 117, Dec. 2005.

CHAWLA, R.; KAUR, H. Plasma antioxidant vitamin status of periparturient cows supplemented with α -tocopherol and β -carotene. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, n. 1, p. 279-285, May 2004.

CHEW, B. P. et al. Effects of vitamin A and β -carotene on plasma progesterone and uterine protein secretions in gilts. **Theriogenology**, v. 18, n. 6, p. 643-654, Dec. 1982a.

CHEW, B. P. et al. Relationship between vitamin A and β -carotene in blood plasma and milk and mastitis in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 11, p. 2111-2118, Nov. 1982b.

CHEW, B. P.; HOLPUCH, D. M.; O'FALLON, J. V. Vitamin A and β -Carotene in Bovine and Porcine Plasma, Liver, Corpora Lutea, and Follicular Fluid. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 6, p. 1316-1322, June 1984.

CHEW, B. P. Role of carotenoids in the immune response. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2804-2811, Sept. 1993.

CHEW, B P. et al. Uptake of β -carotene by ovarian and uterine tissues and effects on steroidogenesis during the estrous cycle in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1063-1067, July 2001.

CHEW, B. P.; PARK, J. Carotenoid action on the immune response. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 257S-261S, Jan. 2004.

CLAGETT-DAME, Margaret; DELUCA, Hector F. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. **Annual review of nutrition**, v. 22, n. 1, p. 347-381, July 2002.

CLARKE, R. T. J.; DI MENNA, MARGARET E. Yeasts from the bovine rumen. *Journal of general microbiology*, v. 25, n. 1, p. 113-117, May 1961.

COMBS JR, G. F. **The vitamins**. Academic press, 2012.

CORREA, M. T.; ERB, H.; SCARLETT, J. Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 5, p. 1305-1312, May 1993.

COULTATE, T.P. Food - The Chemistry of Its Components, 3rd Edition. **Royal Society of Chemistry**, 1996.

CRUZ-MONTERROSA, R. G. et al. Carotenoids digestion in african stargrass (*cynodon plectostachyus*) determined with in situ techniques in cattle [Digestión de carotenoides en pasto estrella (*cynodon plectostachyus*) determinado con técnicas in situ en bovinos]. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 14, p. 1011-1017, Dec. 2011.

DANIEL, L. R. et al. β -Carotene and vitamin A effects on bovine phagocyte function in vitro during the peripartum period. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 1, p. 124-131, Jan. 1991a.

DANIEL, L. R. et al. In vitro effects of β -carotene and vitamin A on peripartum bovine peripheral blood mononuclear cell proliferation. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 3, p. 911-915, Mar. 1991b.

DAVISON, K. L.; SEO, J. Influence of nitrate upon carotene destruction during in vitro fermentation with rumen liquor. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 8, p. 862-864, Aug. 1963.

DAWSON, R. M. C.; HEMINGTON, N. Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. **British Journal of Nutrition**, v. 32, p. 327-340, Feb. 1974.

DE ONDARZA, M. B.; WILSON, J. W.; ENGSTROM, M. Case study: Effect of supplemental β -carotene on yield of milk and milk components and on reproduction of dairy cows. **The Professional Animal Scientist**, v. 25, n. 4, p. 510-516, Aug. 2009.

DRACKLEY, James K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 11, p. 2259-2273, Nov. 1999.

DUNNE, P. G. et al. Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. **Meat Science**, v. 81, n. 1, p. 28-45, Jan. 2009.

DURING, A. et al. Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells β -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 7, p. 1086-1095, July 2002.

EDGE, R.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants—a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 41, n. 3, p. 189-200, Dec. 1997.

EILER, H.; HOPKINS, F. M. Bovine retained placenta: effects of collagenase and hyaluronidase on detachment of placenta. **Biology of reproduction**, v. 46, n. 4, p. 580-585, Apr. 1992.

EILER, H.; HOPKINS, F. M. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 3, p. 436-443, Aug. 1993.

ERB, H. N. et al. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 12, p. 3337-3349, Dec. 1985.

FARMILO, A.; WILKINSON, F. On the mechanism of quenching of singlet oxygen in solution. **Photochemistry and Photobiology**, v. 18, n. 6, p. 447-450, Dec. 1973.

FERNANDEZ, S. C. et al. Low utilization of carotene by sheep. **International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin-und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition**, v. 46, n. 4, p. 446-453, 1975.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, Mar. 1997.

FOLMAN, Y. et al. Adverse Effect of β -Carotene in Diet on Fertility of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 2, p. 357-366, Feb. 1987.

FOURICHON, C.; SEEGER, H.; MALHER, X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1729-1759, June 2000.

FRYE, T. M.; WILLIAMS, S. N.; GRAHAM, T. W. Vitamin deficiencies in cattle. **The Veterinary clinics of North America**. Food animal practice, v. 7, n. 1, p. 217-275, Mar. 1991.

FURR, H. C.; CLARK, R. M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, n. 7, p. 364-377, July 1997.

GANGULY, J.; RAO, M.R.S.; MURTHY, S.K.; SARADA, K. Systemic mode of action of vitamin A. **Vitamin and Hormones**. v.38, p.1, 1980.

GARRETT, E. F. et al. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 6, p. 1170-1178, June 1999.

GOFF, J. P.; KIMURA, K.; HORST, R. L. Effect of Mastectomy on Milk Fever, Energy, and Vitamins A, E, and β -Carotene Status at Parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1427-1436, June 2002.

GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Mannitol as an OH Scavenger in Aqueous Solutions and in Biological Systems. **International Journal of Radiation Biology**, v. 46, n. 6, p. 725-729, Jan. 1984.

GRAVES-HOAGLAND, R. L.; HOAGLAND, T. A.; WOODY, C. O. Effect of β -carotene and vitamin A on progesterone production by bovine luteal cells. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 4, p. 1058-1062, Apr. 1988.

GRÖHN, Y. et al. Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 25-39, Jan. 1990.

GROLIER, P. et al. *In Vitro* and *in Vivo* Inhibition of β -Carotene dioxygenase activity by canthaxanthin in rat intestine. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 348, n. 2, p. 233-238, Dec. 1997.

GROMMERS, F. J. et al. Polymorphonuclear leucocyte function: Relationship between induced migration into the bovine mammary gland and in vitro cell activity. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 23, n. 1, p. 75-83, Nov. 1989.

GUGGER, E. T. et al. n-Carotene Uptake and Tissue Distribution in Ferrets. **The Journal of Nutrition**, v. 122, p. 115-119, June 1992.

GUNNINK, J. W. Post-partum leucocytic activity and its relationship to caesarian section and retained placenta. **The Veterinary Quarterly**, v. 6, p. 55-57. Apr. 1984a.

GUNNINK, J. W. Pre-partum leucocytic activity and retained placenta. **The Veterinary Quarterly**, v. 6, p. 52-54. Apr. 1984b.

GUNNINK, J.W. Retained placenta and leucocytic activity. Pre-partum leucocytic activity and its relationship to cesarean section and retained placenta. Influence of dilution on the chemotatic properties of cotyledon suspensions. **The Veterinary Quarterly**, v. 6, p. 49-104. Apr. 1984c.

HALILOGLU, S. et al. Vitamin A and β -Carotene Levels in Plasma, Corpus

Luteum and Follicular Fluid of Cyclic and Pregnant Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 2, p. 96-99, Apr. 2002.

HAMMON, D. S. et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 113, n. 1, p. 21-29, Apr. 2006.

HEGSTED, D. M.; PORTER, J. W.; PETERSON, W. H. Determination of carotene in silage. **Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition**, v. 11, n. 5, p. 256-258, May 1939.

HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. **European journal of clinical nutrition**, v. 54, p. S47-51, Mar. 2000.

HEUWIESER, W.; GRUNERT, E. Significance of chemotactic activity for placental expulsion in cattle. **Theriogenology**, v. 27, n. 6, p. 907-912, June 1987.

HERDT, T. H.; SEYMOUR, W. M. Serum β carotene concentrations and variability factors in US dairy herds. **Journal of Animal Science**, v. 81, Suppl. 1/ **Journal of Dairy Science**, v. 86, Suppl. 1. T137 (abstract). June 2003

HINO, T.; ANDOH, N.; OHGI, H. Effects of β -Carotene and α -Tocopherol on Rumen Bacteria in the Utilization of Long-Chain Fatty Acids and Cellulose. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 2, p. 600-605, Feb. 1993.

HOLDEN, J. M. et al. Carotenoid content of US foods: an update of the database. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, n. 3, p. 169-196, Sept. 1999.

HURLEY, W. L.; DOANE, R. M. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 3, p. 784-804, Mar. 1989.

IKEDA, S. et al. The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **The Journal of reproduction and development**, v. 51, n. 1, p. 23-35, Feb. 2005.

INABA, T. et al. Plasma concentrations of progesterone, estrogens, vitamin A and β -carotene in cows retaining fetal membranes. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.48, p.505-508, Feb.1986a.

INABA, T. et al. Plasma concentrations of beta-carotene and vitamin A in cows with ovarian cyst. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 48, p. 1275-1278, Aug. 1986b.

JIANG, S.; VACCHIO, M. S. C. E.: Multiple Mechanisms of Peripheral T Cell Tolerance to the Fetal "Allograft". **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3086-3090, Apr. 1998.

JOHNSTON, L. A.; CHEW, B. P. Peripartum Changes of Plasma and Milk Vitamin A and β -Carotene among Dairy Cows with or without Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 8, p. 1832-1840, Aug. 1984.

JENSEN, Søren Krogh; JOHANNSEN, Anna Kirstin Bjørnbak; HERMANSEN, John E. Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, β -carotene and α -tocopherol into cows' milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 04, p. 511-522, Nov. 1999.

KALACĚ, P.; MCDONALD, P. A review of the changes in carotenes during ensiling of forages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, n. 8, p. 767-772, Aug. 1981.

KAEWLAMUN, W. et al. The influence of a supplement of β -carotene given during the dry period to dairy cows on colostrum quality, and β -carotene status, metabolites and hormones in newborn calves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 165, n. 1, p. 31-37, Apr. 2011a.

KAEWLAMUN, W. et al. Does supplementing dairy cows with β -carotene during the dry period affect postpartum ovarian activity, progesterone, and cervical and uterine involution? **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1029-1038, Apr. 2011b.

KAEWLAMUN, W. et al. Effects of a dietary supplement of β -carotene given during the dry period on milk production and circulating hormones and metabolites in dairy cows. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 163, n. 5, p. 235-241, June 2012.

KALACĚ, P. Losses of beta-carotene in unwilted forage crops during silage-making and feeding. **Animal Feed Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 63-69, July 1983.

KAMEJI, Hiroyuki et al. β -Carotene accumulation in 3T3-L1 adipocytes inhibits the elevation of reactive oxygen species and the suppression of genes related to insulin sensitivity induced by tumor necrosis factor- α . **Nutrition**, v. 26, n. 11, p. 1151-1156, Dec. 2010.

KANDA, Hajime et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, June 2006.

KAWASHIMA, C. et al. Relationship between plasma β -carotene concentrations during the peripartum period and ovulation in the first follicular wave postpartum in dairy cows. **Animal Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 1, p. 105-111, Mar. 2009.

KAWASHIMA, C. et al. Effect of β -Carotene Supply During Close-up Dry

Period on the Onset of First Postpartum Luteal Activity in Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. e282-e287, Dec. 2010.

KEATING, E. K.; HALE, W. H.; HUBBERT, Farris. In vitro degradation of vitamin A and carotene by rumen liquor. **Journal of Animal Science**, v. 23, n. 1, p. 111-117, Feb. 1964.

KIMURA, K. et al. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 544-550, Mar. 2002.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2588-2595, July 2006.

KNIGHT, T. W. et al. Effect of dietary vitamin A on plasma and liver carotenoid concentrations and fat colour in Angus and Angus crossbred cattle. **New Zealand journal of agricultural research**, v. 39, n. 2, p. 281-292, Apr. 1996.

KOLB, E. ed. **Fisiologia veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1984. 612p.

KRAMMER, G.; AURICH, J. Concentrations of β -carotene (Carofertin®) and vitamin A in plasma of pigs after intramuscular injection of β -carotene. Konzentrationsverlauf von β -Carotin (Carofertin®) und Vitamin A im Plasma von Schweinen nach intramuskulärer Injektion von β -Carotin. **Deutsche tierärztliche Wochenschrift**, v. 5, n. 12, p. 444-448, Dec. 2008.

KREMER, W. D. J. et al. Severity of Experimental *Escherichia coli* Mastitis in Ketonemic and Nonketonemic Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 11, p. 3428-3436, Nov. 1993.

KRINSKY, N. I.; DENEKE, S. M. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 69, n. 1, p. 205-210, Mar. 1982.

KRINSKY, Norman I.; YEUM, Kyung-Jin. Carotenoid–radical interactions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 305, n. 3, p. 754-760, June 2003.

KURZ, Christina; CARLE, Reinhold; SCHIEBER, Andreas. HPLC-DAD-MS characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 522-530, Sept. 2008.

LEBLANC, S. J. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2223-2236, Sept. 2002.

LEBLANC, S. J. et al. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 3, p. 609-619, Apr. 2004.

LEBLANC, S. J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 102-114, Apr. 2008.

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**, v. 19, n. 11, p. 632-636, Nov. 1968.

MALLARD, B. A. et al. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 585-595, Feb. 1998.

MALDONADE, I. R. **Produção de carotenoides por leveduras**. 2003. 119 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Mar. 2003.

MARCIN, A.; NAĎ, P. Concentration of carotene in alfalfa (*medicago sativa*) as a function of vegetational stage. **Folia Veterinaria**, p. 37, Sept. 2012.

MARTIN, F. H. et al. Vitamin A activity of carotenes in corn silage fed to lambs. **The Journal of Nutrition**, v. 96, n. 2, p. 269-274, May 1968.

MARTIN, H. D. et al. Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. **Pure and applied chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2253-2262, Jan. 1999.

MAYNE, S. T.; PARKER, R. S. Antioxidant activity of dietary canthaxanthin. **Nutrition and Cancer**, v. 12, p. 225-236, Dec. 1989.

MAYNE, S. T. et al. Dietary beta carotene and lung cancer risk in US nonsmokers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 1, p. 33-38, Oct. 1994.

MCDOWALL, F. H.; MCGILLIVRAY, W. A. Studies on the properties of New Zealand butterfat: VII. Effect of the stage of maturity of ryegrass fed to cows on the characteristics of butterfat and its carotene and vitamin A contents. **Journal of Dairy Research**, v. 30, n. 01, p. 59-66, Feb. 1963.

MCDOWELL, A. K. R.; MCDOWALL, F. H. 502. The vitamin A potency of New Zealand butter. **Journal of Dairy Research**, v. 20, n. 01, p. 76-100, Feb. 1953.

MCDOWELL, L. R. **Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition**. Acad. Press, 1989.

MCDOWELL, L. R.. **Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition**. Elsevier, 2012.

MCGILLIVRAY, W. A. The apparent intestinal synthesis of carotene by sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 5, n. 02, p. 223-228, May 1951.

MEHRZAD, J. et al. Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 03, p. 399-415, Aug. 2001.

MICHAL, J. J. et al. Modulatory Effects of Dietary β -Carotene on Blood and Mammary Leukocyte Function in Periparturient Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 5, p. 1408-1421, May 1994.

MICOZZI, Marc S. et al. Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and beta-carotene supplements in men. **The American journal of clinical nutrition**, v. 55, n. 6, p. 1120-1125, June 1992.

MORA, Ofelia et al. In vitro and in situ disappearance of β -carotene and lutein

from lucerne (*Medicago sativa*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 2, p. 273-276, June 1999.

MORA, O. et al. Presence of fed β -carotene in digesta, excreta, blood, and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, n. 1, p. 133-139, Mar. 2001.

MOORE, Amy C.; GUGGER, Eric T.; ERDMAN JR, John W. Brush border membrane vesicles from rats and gerbils can be utilized to evaluate the intestinal uptake of all-trans and 9-cis beta-carotene. **The Journal of nutrition**, v. 126, n. 11, p. 2904-2912, Nov. 1996.

MORALES, Adriana et al. Cloning of the Bovine β -Carotene-15, 15'-Oxygenase and Expression in Gonadal Tissues. **International journal for vitamin and nutrition research**, v. 76, n. 1, p. 9-17, Jan. 2006.

MORRISON, F. B. et al. Feeds and feeding. A handbook for the student and stockman. **Feeds and feeding. A handbook for the student and stockman.**, n. 20, Jan. 1917.

MOULTON, J. E. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. Univ of California Press, 1978.

MURPHY, GILLIAN et al. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. **Biochemical Journal**, v. 162, n. 1, p. 195, Jan. 1977.

MUSICKI, B.; ATEN, R. F.; BEHRMAN, H. R. Inhibition of protein synthesis and hormone-sensitive steroidogenesis in response to hydrogen peroxide in rat luteal cells. **Endocrinology**, v. 134, n. 2, p. 588-595, Feb. 1994.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. Part III. **Reference of 1996 Dairy Health and Health Management**. Washigton: USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Nov. 1996. 153 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th rev. ed. Washington: National Academy, 2001. 381 p.

NOZIÈRE, P. et al. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, n. 3, p. 418-450, Dec. 2006.

NYS, Y. et al. Dietary carotenoids and egg yolk coloration-a review. **Archiv für Geflügelkunde**, v. 64, n. 2, p. 45-54, 2000.

OLDHAM, E. R.; EBERHART, R. J.; MULLER, L. D. Effects of supplemental vitamin A or β -carotene during the dry period and early lactation on udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3775-3781, Nov. 1991.

OLTENACU, P A.; FRICK, A; LINDHÉ, B. Epidemiological study of several clinical diseases, reproductive performance and culling in primiparous Swedish cattle. **Preventive veterinary medicine**, v. 9, n. 1, p. 59-74, June 1990.

OMENN, G S. et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **New England journal of medicine**, v. 334, n. 18, p. 1150-1155, May. 1996.

OPSOMER, Geert et al. Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? **Animal reproduction science**, v. 56, n. 3, p. 211-222, Aug. 1999.

PAAPE, M. et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109-121, Apr. 2002.

PACKER, L. Antioxidant Action of Carotenoids in Vitro and in Vivo and

Protection against Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. In: **Annals**

of the New York Academy of Sciences. Annals...New York: NYU, v. 691, n. 1, p. 48-60, Dec. 1993.

PARK, Y. W. et al. Effects of Processing Methods and Agronomic Variables on Carotene Contents in Forages and Predicting Carotene in Alfalfa Hay with Near-Infrared-Reflectance Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 2, p. 235-245, Feb. 1983.

PARVIN, S G.; SIVAKUMAR, B. Nutritional status affects intestinal carotene cleavage activity and carotene conversion to vitamin A in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 3, p. 573-577, Mar. 2000.

PATTERSON, D. S. P. Plasma carotenoids and fat mobilization in stall-fed cattle. **Nature**, v. 206, 1069-1069, June 1965.

DE PEE, Saskia et al. Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. **The lancet**, v. 346, n. 8967, p. 75-81, July 1995.

POTTIER, J. et al. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 685-692, Feb. 2006.

PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. **Annual Review of Physiology**, v. 48, n. 1, p. 657-667, 1986.

QIAN, C. et al. Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1221-1229, June 2012.

RAKES, A. H. et al. Effects of Adding Beta-Carotene to Rations of Lactating Cows Consuming Different Forages. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1732-1737, July 1985.

RAMÍREZ, I.; LLOBERA, M.; HERRERA, E. Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. **Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 333-341, Apr. 1983.

RAMOS, P.; MARTIN-HIDALGO, A.; HERRERA, E. Insulin-Induced Up-Regulation of Lipoprotein Lipase Messenger Ribonucleic Acid and Activity in Mammary Gland 1. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1089-1093, Mar. 1999.

RAPOPORT, R. et al. Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1380, n. 1, p. 133-140, Mar. 1998.

REBOUL, Emmanuelle et al. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). **Biochem. J**, v. 387, p. 455-461, Nov. 2005.

REYNOSO, C. R. et al. β -Carotene and lutein in forage and bovine adipose tissue in two tropical regions of Mexico. **Animal Feed Science and Technology**, v. 113, n. 1, p. 183-190, Mar. 2004.

RILEY, J C. M.; BEHRMAN, H. R. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. **Experimental Biology and Medicine**, v. 198, n. 3, p. 781-791, Dec. 1991.

ROCK, C. L. et al. Plasma carotenoid levels in human subjects fed a low carotenoid diet. **The Journal of Nutrition**, v. 122, n. 1, p. 96-100, Jan. 1992.

RODGERS, R. J. et al. The physiology of the ovary: maturation of ovarian granulosa cells and a novel role for antioxidants in the corpus luteum. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 53, n. 1, p. 241-246, June 1995.

ROGERS, A. M. et al. Maternal-fetal tolerance is maintained despite

transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and

its ligand. **European journal of immunology**, v. 28, n. 11, p. 3479-3487, Nov. 1998.

ROMANIUKOWA, K. Phagocytosis in the uterus. **Congress proceedings: 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**. Illinois: University of Illinois, Champaign-Urbana, IL. p. 33-38, June 1984.

ROSENDO, O. et al. Relationship of mild fatty liver, beta-carotene, vitamins a and e status of periparturient holstein cows. **Revista Científica: Producción Animal**, v. 20, n. 4, p. 399-408, July 2010.

SALES, J. N. S. et al. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocopherol. **Animal Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1, p. 77-89, June 2008.

SCHWEIGERT, F. J. Effect of gestation and lactation on lipoprotein pattern and composition in dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal**

Nutrition, v. 63, n. 1-5, p. 75-83, June 1990.

SCHWEIGERT, F. J.; EISELE, W. Parenteral β -carotene administration to cows: effect on plasma levels, lipoprotein distribution and secretion in the milk. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v. 29, n. 3, p. 184-191, Sept. 1990.

SCHWEIGERT, F. J.; RAMBECK, W. A.; ZUCKER, H. Transport of

β -carotene by the serum lipoproteins in cattle. **Journal of Animal Physiology**

and Animal Nutrition, v. 57, n. 1-5, p. 162-167, Aug. 1987.

SCHWEIGERT, F. J.; ZUCKER, H. Concentrations of vitamin A, β -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. **Journal of reproduction and fertility**, v. 82, n. 2, p. 575-579, Mar. 1988.

SCHWEIGERT, F. J. et al. Effect of dietary β -carotene on the accumulation of β -carotene and vitamin A in plasma and tissues of gilts. **Reproduction nutrition development**, v. 41, p. 47-55, Jan. 2001.

SCHWEIGERT, F. J. et al. Effect of dietary β -carotene on the early embryonic

development and uterine fluid composition of gilts. **Journal of animal**

physiology and animal nutrition, v. 86, n. 7-8, p. 265-272, Aug. 2002.

SCHWEIGERT, F. J. Research Note: Changes in the concentration of β -Carotene, α -Tocopherol and retinol in the bovine corpus luteum during the ovarian cycle. **Archives of Animal Nutrition**, v. 57, p. 307-310, Sept. 2003.

SCHWEIGERT, F.J., ENJALBERT, F., MOTHES, R., HURTIENNE, A., IMMIG, I. Cooperative European study for the validation of a novel cow-side-carotene assay in serum and blood. In: **Proceedings of 13th International**

Conference on Production Disease in Farm Animals, Leipzig, Germany, p. 162. July 2007.

SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Determination of β -carotene and lutein available from green leafy vegetables by an in vitro digestion and colonic fermentation method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2936-2940, Mar. 2005.

SHAPIRO, Stanley S. et al. Kinetic characteristics of beta-carotene uptake and depletion in rat tissue. **The Journal of Nutrition**, v. 114, n. 10, p. 1924-1933, Oct. 1984.

SHARPE, K. L.; EILER, H.; HOPKINS, F. M. Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome. **Biology of reproduction**, v. 43, n. 2, p. 229-235, Aug. 1990.

SHAW, J. C. Studies on Ketosis in Dairy Cattle. X. The Effect of a Vitamin A Deficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 33, n. 7, p. 486-495, July 1950.

SIES, Helmut. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. S31-S38, Mar. 1991.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315S-1321S, Dec. 1995.

SMITH, K. L. et al. Effect of Vitamin E and Selenium Supplementation on Incidence of Clinical Mastitis and Duration of Clinical Symptoms. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 6, p. 1293-1300, June 1984.

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1, p. 104-109, Mar. 2009.

TALAVERA, F.; CHEW, B. P Comparative role of retinol, retinoic acid and β -carotene on progesterone secretion by pig corpus luteum in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.82, n.2, p.611-615, Mar. 1988.

TELFER, A. et al. Beta-Carotene Quenches Singlet Oxygen Formed by Isolated Photosystem II Reaction Centers. **Biochemistry**, v. 33, n. 48, p. 14469-14474, Dec. 1994.

TJOELKER, L. W. et al. Bovine Vitamin A and β -Carotene Intake and Lactational Status. 1. Responsiveness of Peripheral Blood Polymorphonuclear Leukocytes to Vitamin A and β -Carotene Challenge In Vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 11, p. 3112-3119, Nov. 1988.

TJOELKER, L. W. et al. Effect of dietary vitamin A and β -carotene on polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte function in dairy cows during the early dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 4, p. 1017-1022, Apr. 1990.

U.S. INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION BOARD. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes: for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington, D.C., **National Academy Press**, 2001, 797p.

VALDUGA, E et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, Oct. 2009.

VAN HET HOF, K. H. et al. Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 2, p. 261-268, Aug. 1999a.

VAN HET HOF, K. H. et al. Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. **British journal of nutrition**, v. 82, n. 03, p. 203-212, Sept. 1999b.

VAN VLIET, T. et al. Beta-Carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 2, p. 499-508, Feb. 1996.

VELIČKOVIĆ, M.; VUKOVIĆ, D. Uticaj parenteralne aplikacije beta-karotina na plodnost krava. **Veterinarski glasnik**, v. 62(1-2), p. 53-66. Sept. 2008.

WALKER, P. J. et al. Sources of variation in subcutaneous fat colour of beef carcasses. In: **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**. 1990. p. 416-419.

WANG, J. Y.; HAFI, C. B.; LARSON, L. L. Effect of Supplemental β -Carotene on Luteinizing Hormone Released in Response to Gonadotropin-Releasing Hormone Challenge in Ovariectomized Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 2, p. 498-504, Feb. 1988.

- WANG, J. Y.; OWEN, F. G.; LARSON, L. L. Effect of beta-carotene supplementation on reproductive performance of lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 1, p. 181-186, Jan. 1988.
- WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, n.6, p.1272-1277, Dec. 2002.
- WANG, M. G. et al. Effect of supplementing vitamin E and β -carotene to prepartum Holstein cattle on health and reproductive responses. **Journal of Animal Science**, v. 91, E-Suppl. 2/ **Journal of Dairy Science**, v. 96, E-Suppl. 1. W76 (abstract). 2013.
- WEISS, W. P. et al. Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 2, p. 381-390, Feb. 1990.
- WENG, B. C. et al. Beta-carotene uptake and changes in ovarian steroids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 5, p. 1284-1290, May 2000.
- WICKENHEISSER, Jessica K. et al. Retinoids and retinol differentially regulate steroid biosynthesis in ovarian theca cells isolated from normal cycling women and women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 8, p. 4858-4865, Aug. 2005.

WILLIAMS, P. E. V.; BALLETT, N.; ROBERT, J. C. A review of the provision of vitamins for ruminants. In: **Proceedings of the preconference symposium of the Cornell nutrition conference**. Ithaca: University of Cornell, NY. 1998. p. 7-37.

YAN, H. X.; SUN, L. S.; ZHAO, G. Q. Effect of β -carotene on selected indices of in vitro rumen fermentation in goats. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 16, n. 2, p. 581-585, Sept. 2007.

YANG, A.; LARSEN, T. W.; TUME, R. K. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. **Crop and Pasture Science**, v. 43, n. 8, p. 1809-1817, July 1992.

YANG, A.; TUME, R. K. A comparison of beta-carotene-splitting activity isolated from intestinal mucosa of pasture-grazed sheep, goats and cattle. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 30, n. 2, p. 209-217, June 1993.

YANG, A. et al. Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture-and grain-fed cattle. **Meat Science**, v. 60, n. 1, p. 35-40, Jan. 2002.

YOUNG, F. M.; LUDERER, W. B.; RODGERS, R. J. The antioxidant β -carotene prevents covalent cross-linking between cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 109, n. 1, p. 113-118, Mar. 1995.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

**SUPPLEMENTATION OF LATE GESTATION DAIRY COWS WITH
BETA-CAROTENE**

Artigo formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico
Theriogenology

ABSTRACT

The pre-calving supplementation of beta-carotene was evaluated. The data set contained 283 Holsteins that received a treatment for >14 d (29.1 ± 6.9 d). Cows were paired blocked by parity and expected calving date and assigned to a treatment: Beta-carotene (1.2 g/cow/d) or Control. The same TMR batch was offered to all cows and beta-carotene was top dressed per cow once a day. Milk yield was recorded daily and sampled at 30.1 ± 8.3 d post-calving. Frequency distributions were analyzed with GENMOD of SAS using logistic regression for binomial data. Continuous variables were analyzed with PROC MIXED of SAS. Within parity, nonparametric estimates of the survivor function for reproductive variables were computed using the product-limit method of the Kaplan-Meier method with LIFETEST. Plasma beta-carotene content at the start of the experiment was similar ($2.99 \mu\text{g/mL}$, $P=0.59$) and peaked at $3.26 \mu\text{g/mL}$ on day -15 pre-calving for supplemented cows ($2.62 \mu\text{g/mL}$ for Control, $P<0.01$). Colostrum density, milk yield, and milk solids content were similar ($P>0.32$). Milk yield from d 20 to 109 of lactation was 3105 kg for primiparous and 3595 kg for multiparous ($P<0.01$). Beta-carotene tended to increase milk protein content from 2.90 to 2.96% ($P=0.09$) and to decrease the proportion of primiparous with a milk fat to protein ratio >1.5 from 22.6 to 6.4% ($P=0.08$). The proportion of primiparous with difficult calving, SCC $>200,000$ cells/mL, metritis, progesterone >1 ng/mL at 21 and 42 d, % conception at first service, and % pregnant at 90 and 150 d were similar ($P>0.46$). There was a trend for decreased incidence of SCC $>200,000$ cells/mL in multiparous supplemented with beta-carotene (38.9% vs. 28.1%, $P=0.12$), other variables were similar ($P>0.21$). Beta-carotene reduced the proportion of multiparous with retained placenta 12 h post-calving from 29.9% to 21.7%, time of placenta release was 392 min (340 to 440) for beta-carotene and 490 min (395 to 540) for Control (Median and 95% confidence interval. LogRank $P=0.05$ and Wilcoxon $P=0.04$). For primiparous, beta-carotene did not determine placenta release (incidence was 15.4%). Responses in the intervals from calving to first estrous, to first service, and to conception were not detected. The pre-calving supplementation of beta-carotene increased the plasma content around calving. There was no detectable response in milk yield or reproductive performance. Beta-carotene reduced the incidence of retained placenta in multiparous cows.

Keywords: Beta-carotene, retained placenta, transition period

1. INTRODUCTION

Carotenoids, such as beta-carotene, can be converted to vitamin A in cells of the intestinal mucosa, liver, uterus and ovaries [1,2,3]. Carotenoids also have antioxidant function, protecting cells and cell components against reactive oxygen species [4]. The antioxidant defense system of dairy cows around calving may be overloaded with reactive oxygen species, predisposing animals to immune system related diseases, such as retained placenta, metritis and mastitis [5,6,7]. Beta-carotene supplementation increased the proliferative response of lymphocytes to mitogens and enhanced the phagocytic ability of polymorphonuclear neutrophils [8,9]. Beta-carotene deficiency may play a role on reproduction, lactation performance and health, justifying its supplementation to dairy cows around calving.

Under confinement dairy production systems, total farm reliance on preserved forages is not uncommon. The carotenoid content of forages is reduced during storage as silage or hay [10] and the content in most grains is not substantial. Positive responses in dairy cow fertility and lactation performance have been observed when beta-carotene was supplemented after calving [11,12], although absent [13,14] or negative [15] effects on reproduction have been reported. The diverse response to beta-carotene supplementation post-calving may be related to the duration of supplementation, to the beta-carotene content of the basal diet, to the blood plasma concentration induced by the supplement, and by the degree of immune depression and oxidative stress of animals [11].

Although the post-calving supplementation of beta-carotene may be beneficial to dairy cows, Kaewlamun et al. [16] and Wang et al. [17] reported benefits in uterine health of cows supplemented with beta-carotene before calving. Kawashima et al. [18] also showed in a retrospective study that ovulatory cows in the first follicular wave postpartum had higher plasma beta-

carotene concentration before calving than anovulatory cows. These studies suggest that beta-carotene supplementation before calving may improve fertility in early lactation.

In small confinement systems adopting multiple diets, it is not uncommon for fresh cows to go directly to the most nutrient dense diet of the farm, without having access to a post-calving specific diet. The permanence time of cows in post-calving groups is also variable, depending on herd management practices and degree of group crowding. This scenario makes difficult the adoption of nutrition strategies specially focused on the entire transition period (pre- and post-calving). Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of beta-carotene supplementation during the pre-calving transition period on lactation performance, reproduction and health of early lactation dairy cows

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Animals and treatments*

Experimental procedures were approved by the Federal University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals (Protocol n° 056/13). The study was conducted in a commercial dairy herd (21°55'S, 36°36'W, Brazil). The farm separated primiparous from multiparous cows during the pre-calving transition period and along the lactation. Within these two calving order groups, cows were paired blocked based on expected calving date and were randomly assigned to a treatment at days -25 to -31 of the predicted calving date (goal was a 28-day pre-calving transition period). Cows were moved from the dry cow to the transition cow group once per week. Treatments were: 1.2 g/d of beta-carotene (12 g/d of Rovimix, containing 10% beta-carotene. DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil) or Control. The transition cow free stalls with self-lockers were split into two identical halves (similar bedding and feed bunk availability per cow). The same TMR batch was offered to all cows. The beta-carotene was top dressed once daily to each cow.

Twelve cows that received the pre-calving transition diet for less than 14 days were removed from the final data set. For the 283 cows that received the pre-calving diet for 14 days or more, the duration of the pre-calving transition period was 29.1 ± 6.9 days (Mean \pm SD). The period from the beginning of treatments allocation till the day the last cow completed 150 days in milk lasted from January 24th to September 27th, 2012. Calvings occurred from February 1st to April 30th. For each response variable, the number of experimental units varied depending on data availability and reliability. The number of observations for each variable is described in Table 1.

2.2. Diets

The composition of the diets was defined by the manager without the interference of the research team. The formulated diet for the pre-calving transition period contained (% of DM): 55.9% corn silage, 17.2% green chop Tifton, 8.9% soybean meal, 3.9% finely ground corn, 6.4% citrus pulp, 4.8% whole cottonseed, and 2.9% minerals, vitamins, and additives. The formulated lactating cow diet contained (% of DM): 34.8% corn silage, 8.4% green chop Tifton, 13.8% soybean meal, 6.1% whole heated soybeans, 18.6% finely ground corn, 11.9% citrus pulp, 2.3% whole cottonseed, and 4.1% minerals, vitamins, and additives.

2.3. Blood sampling for beta-carotene and progesterone assays

Blood samples from the coccygeal vessels were obtained on day 0 (first day of supplementation), between days -18 and -10 relative to calving (day -15), and on days 7 and 56 of lactation. Blood beta-carotene content was quantified as in [19] using the iEx system, a single-step denaturation, and beta-carotene extraction into organic solvent, followed by beta-carotene measurement using iCheck (BioAnalyt GmbH, Teltow, Germany), a portable spectrophotometer. Concentrations were classified as High (≥ 3.5 $\mu\text{g/mL}$), Intermediate (≥ 2 to < 3.5 $\mu\text{g/mL}$) or Low (< 2 $\mu\text{g/mL}$).

Blood serum progesterone (P4) concentration was analyzed in samples from the coccygeal vessels obtained on days 21 and 42 of lactation. Serum was stored at -20°C until assayed for P4 concentration by solid phase RIA using a Coat-A-Count Progesterone kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). The intra-assay coefficient of variation for P4 assays were 0.14 and 1.68, for low and high samples, and the inter-assay were 9.93 and 2.12%, for low and

high samples. Cows with luteal activity were defined as serum progesterone concentration above 1 ng/mL.

2.4. Calving difficulty, colostrum density, and placenta release

Immediately before the expected calving date, cows were moved to sand-bedded maternity pens. Calving was classified by farm personal as unassisted or assisted. Colostrum density was determined with a lactodensimeter. Time post-calving of placenta release was measured up to 12 h of calf delivery. The non-detachment of fetal membranes within 12 hours was considered as retained placenta.

2.5. Milk yield and composition

Cows were milked three times per day starting at 4 AM, 12 AM, and 8 PM. Milk yield of each cow was recorded daily from days 20 to 109 of lactation and samples were obtained between days 15 and 42 of lactation. Milk samples were preserved in 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol and the content of solids and somatic cells (SCC) was analyzed by infrared analysis (Bentley 2000. Bentley Instruments Inc., Chaska, USA). Milk fat to protein ratio greater than 1.5 was considered as a sign of ketosis [20]. A SCC greater than 200,000 cells/mL was considered as mastitis. The SCCs was converted to a linear scale from 0 to 9 (linear SCC), the midpoint of each score represented by the following linear SCC values (x 1000 cells/mL): 12.5 to linear SCC 0; 25 to SCC linear 1; 50 to linear SCC 2; 100 to linear SCC 3; 200 to linear SCC 4; 400 to linear SCC 5; 800 to linear SCC 6; 1600 to linear SCC 7; 3200 to linear SCC 8 and 6400 to linear SCC 9.

2.6. Reproductive management

Estrus detection was performed visually. Cows were kept under routine herd reproductive management practices. Rectal palpation of all cows was performed by the herd veterinarian at around 30 days of lactation. Purulent secretion or presence of liquid in uterus at ultrasound exam was defined as metritis. Cows were then transrectal palpated at two-week intervals until insemination after a 60 d voluntary waiting period. Only natural estrus or induced with prostaglandin F₂ α were used to inseminate the cows. Pregnancy diagnosis by ultrasonography (Aloka SSD 500[®], 5 MHz linear transducer, Tokyo, Japan) was performed from day 25 to 38 after insemination and confirmation was performed 14 days later.

2.7. Statistical Analyses

Frequency distributions were analyzed with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Continuous variables were analyzed with the MIXED procedure of SAS with a model containing the fixed effects of Parity (primiparous, multiparous), Block within Parity, Treatment (Control, Beta-carotene) and the interaction of Parity and Treatment. Analysis was also performed for the primiparous and the multiparous cow data sets separately, with a model that did not contain the Parity effect. Blood beta-carotene content was also analyzed with a model containing the fixed effects of event (difficult calving, retained placenta, milk fat content to protein content ratio, metritis, mastitis, P4 at 21d, P4 at 42d, conception at 1st service, pregnancy at 90d and pregnancy at 150d), sampling day, and the interaction of event and sampling day. Within parity, nonparametric estimates of the survivor function for variables calving to 1st estrous, calving to 1st service, calving to conception,

and time from calving to placenta release were computed using the product-limit method of the Kaplan-Meier method, by the LIFETEST procedure of SAS. Survival curves were generated. Comparison of the survival curves between the two treatments used rank tests for homogeneity: Log-rank and Wilcoxon test. The log-rank test places more weight on larger survival times, and the Wilcoxon test places more weight on early survival times.

3. RESULTS

The blood content of beta-carotene at the start of the pre-calving transition period (Day 0) was similar across treatments (Tables 2 and 3). In relation to Day 0, blood content at day -15 relative to calving was decreased for cows on Control, while it was increased for the beta-carotene supplemented cows (Table 3). Blood beta-carotene content of supplemented cows peaked at 3.3 µg/mL on Day -15. Blood concentrations were lowest immediately after calving, although they were increased by the supplement. Primiparous cows had lower blood beta-carotene content than multiparous only at Day 0 (Table 3). The pre-calving supplementation of beta-carotene increased the blood content around calving, but the difference between treatments decreased with the advance in lactation.

There was no evidence for a response to beta-carotene supplementation in colostrum density, milk yield, and milk fat content (Table 4). However, beta-carotene supplementation tended ($P=0.09$) to increase milk protein content. Linear SCC and the ratio of fat to protein in milk were lower for primiparous than for multiparous cows. Peak milk yield was around 46 kg/d for primiparous and 53 kg/d for multiparous, and the interval from calving to peak milk yield was smaller for multiparous than for primiparous cows.

There was a trend ($P=0.08$) for a decreased proportion of primiparous cows with a milk fat to protein ratio greater than 1.5 when beta-carotene was supplemented (Table 5). There was also a trend ($P=0.12$) for a decreased incidence of SCC greater than 200,000 cells/mL for multiparous cows supplemented with beta-carotene (Table 6). Despite the lack of strong statistical evidence, the pre-calving supplementation of beta-carotene apparently favored a lower incidence of ketosis and mastitis.

The supplementation of beta-carotene reduced the time of placenta release for multiparous cows (Figure 1), reducing the proportion of cows with retained placenta 12 h post-calving from 29.9% to 21.7%. For primiparous cows, in which the proportion of cows with retained placenta was 15.4%, beta-carotene supplementation did not determine placenta release (Figure 2), suggesting that the supplementation was effective only when the incidence of the disorder was high.

The supplementation of beta-carotene did not determine the proportion of cows pregnant at 1st service, and at 90 or 150 days of lactation, or the proportion of cows with serum progesterone content above 1 ng/mL at days 21 and 42 post-calving (Tables 5 and 6). In addition, there was no response in the intervals from calving to 1st estrous (Figures 3 and 4) and from calving to conception (Figures 5 and 6). There was an unexpectedly trend for multiparous cows supplemented with beta-carotene to have an extended calving to 1st service interval (Figure 7), although this interval was similar for primiparous cows supplemented or not (Figure 8).

Regardless of supplementation, blood beta-carotene content was higher for cows with improved reproduction and without mastitis (Table 7). There was also a trend for increased blood beta-carotene content for cows with milk fat to protein ratio greater than 1.5, and with serum progesterone greater than 1 ng/mL at 21 and 42 days of lactation (Table 7). The relationship between these variable

and blood beta-carotene content was consistent along sampling days, no treatment by day interaction was detected. No difference in blood beta-carotene content was observed for cows with or without retained placenta, metritis, or difficult calving (Table 7).

4. DISCUSSION

The lower content of beta-carotene in blood at Day 0 for primiparous compared to multiparous cows suggests that heifers were more deficient in this compound than lactating cows. The farm routinely used some green chop grass as a source of long fiber for lactating cows, while heifers were fed on silage as the major feed ingredient. Beta-carotene deficiency may be an issue not only for lactating animals, but also during the raising phase. Although parity had an effect on blood beta-carotene content before supplementation begun, content at Day 0 was similar for both treatments. The onset of active mammary function quickly eliminated the parity effect on blood beta-carotene content.

Blood beta-carotene content of supplemented cows peaked at Day -15, two weeks after the start of the supplementation. The mean 3.3 $\mu\text{g/mL}$ content for supplemented cows was lower than the 7.5 $\mu\text{g/mL}$ content two weeks before calving of Kaewlamum et al [16]. Those authors supplemented pre-calving cows with 1 g/d of beta-carotene for six weeks; blood beta-carotene was 3 $\mu\text{g/mL}$ eight weeks prior to calving (at dry-off), and 6.5 $\mu\text{g/mL}$ with two weeks of supplementation. The lower blood content value in our study may have been the result of a shorter duration of the supplementation period or of a supplementation period that was initiated nearer to the active functioning of the mammary gland in preparation for the next lactation. However, blood beta-carotene concentration was lowest immediately after calving in both experiments, although it was increased by the supplement.

The lowest blood beta-carotene content immediately after calving (Day 7) is in agreement with other reports [15,16]. It has been attributed to the uptake of the compound by the mammary gland for colostrogenesis, specially during the last week of gestation [8,21,22]. The oxidation of beta-carotene by an increased oxidative stress and the physiological decay in dry matter intake immediately around calving may also contribute to this observation [23].

The supplementation of beta-carotene prior to calving did not determine milk yield in early lactation. Similar response has been observed by another [24]. However, Aréchiga et al [11] reported an increase in milk yield when cows under heat stress were supplemented with beta-carotene from day 15 post-partum up to 170 days in lactation. Oldham et al [25] also observed a trend for increased milk yield when cows were supplemented with beta-carotene before (75 days) and after (42 days) calving. These results suggest that to elicit a positive milk yield response to beta-carotene, the supplementation may need to be done in early lactation. However, we observed a trend ($P=0.09$) for increased milk protein content for cows supplemented with beta-carotene. The mechanism for this response is unclear, although it may deserve consideration, since the magnitude of the response for multiparous cows was similar to the response to methionine supplementation (26,27), around 0.1 milk protein percentage units.

A trend ($P=0.08$) for decreased proportion of primiparous cows with a milk fat to protein ratio greater than 1.5 was observed in response to beta-carotene supplementation. It suggests that the supplement may have had a beneficial effect on the incidence of ketosis in first lactation [20]. Although previous studies have not detected differences in plasma non-esterified fatty acids and glucose in response to beta-carotene supplementation before calving [24,28], the large numerical difference in the frequency between supplemented and Control cows (22.6% vs. 6.4%) suggests that this finding may deserve further evaluation. A trend ($P=0.12$) for decreased proportion of multiparous

cows with SCC greater than 200,000 cells/ml in response to beta-carotene supplementation was also observed. Bian et al (29) and Wang et al (24) also observed positive effects of beta-carotene supplementation before calving on the incidence of mastitis in dairy cows. Beta-carotene acts as an antioxidant and can improve immune function [8,9]. Despite the lack of strong statistical evidence, the pre-calving supplementation of beta-carotene apparently favored a lower incidence of ketosis and mastitis.

A positive effect of the supplement on immune function is also indicated by the reduction for multiparous cows in the momentum post-partum of placenta release. Michal et al [9] detected an improvement in phagocytic activity and killing ability of blood neutrophils and a higher blood lymphocyte proliferation in response to mitogenic agents in dairy cows supplemented with beta-carotene before and after calving, translated in a lower incidence of retained placenta and metritis. However, primiparous cows that had a lower incidence of retained placenta than multiparous (15.4% vs. 25.8%), also had lower blood beta-carotene content at Day 0 and similar content immediately before calving, emphasizing the multifactorial nature of the disorder, certainly not determined only by the content of beta-carotene in blood.

Despite the reduction in placenta retention, treatments did not determine uterine health and time of first ovulation. The pre-calving supplementation of beta-carotene was only capable of affecting a response variable event occurring at calving (placenta release), or the therapeutic procedures adopted by the farm was capable of masking a treatment effect on reproductive tract status. An increase in plasma hydroxyproline concentration, suggestive of a more complete uterine involution [16], and a decreased incidence of puerperal metritis in cows with retained placenta [17], have been reported in response to the pre-calving supplementation of beta-carotene.

The supplementation of beta-carotene did not determine the intervals from calving to first estrous and from calving to conception, neither the proportion of cows pregnant at first service, and at 90 or 150 days of lactation, or the proportion of cows with plasma progesterone content above 1ng/mL at days 21 and 42 post-calving. The similarity in the duration of the interval from calving to first detected estrous suggests that the supplement did not induce gain in estrous behavior. Kaewlamum et al [16] also did not detect a favorable response in reproductive performance of dairy cows to the pre-calving supplementation of beta-carotene. The supplementation of beta-carotene post-calving may be required to elicit an increase in plasma levels in early lactation, possibly inducing a positive response in reproductive performance. The supplementation of dairy cows with beta-carotene has improved the pregnancy rate when it was performed for at least 90 [11] or 105 [12] days post-partum.

Although there was no detectable effect of the pre-partum supplementation of beta-carotene on conception rate, cows that conceived at 1st service, and were pregnant at 90 and 150 days had higher blood beta-carotene content than non-pregnant cows. Cows with serum progesterone content greater than 1 ng/mL at 21 and 42 days also had higher blood concentration of beta-carotene than cows showing no luteal function. Kawashima et al [18] also showed a positive relationship between plasma beta-carotene content before calving and ovulation in early lactation. Cows with low SCC also had higher blood beta-carotene than cows with SCC greater than 200,000 cells/mL. Chew et al [30] reported a negative relationship between California Mastitis Test scores and plasma beta-carotene content in dairy cows. These results suggest that beta-carotene may indeed have a role in immune related diseases and fertility in dairy cows. High blood beta-carotene content was also related to increased milk fat to protein ratio, suggesting that increased body fat mobilization increased beta-carotene content in blood [31,32].

5. CONCLUSIONS

The supplementation of beta-carotene before calving increased blood content around calving, but the response decreased with the advance in days of lactation. Multiparous cows supplemented with beta-carotene had a lower incidence of retained placenta. There was no detectable response in milk yield or reproductive performance. Beta-carotene supplementation both before and after calving may be required to elicit pronounced responses in reproduction, performance, and health of dairy cows.

REFERENCES

- [1] Chew BP, Rasmussen H, Pubols MH, Preston RL. Effects of vitamin A and β -carotene on plasma progesterone and uterine protein secretions in gilts. *Theriogenology* 1982;18:643-54.
- [2] Borel P, Drai J, Faure H, Fayol V, Galabert C, Laromiguiere M, Le Moel G. Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. *Ann Biol Clin* 2005;63:165–77.
- [3] Morales A, Rosas A, González A, Antaramian A, Varela-Echavarría A, Shimada A, Mora O. (2006). Cloning of the Bovine β -Carotene-15, 15'-Oxygenase and Expression in Gonadal Tissues. *International journal for vitamin and nutrition research*, 76(1), 9-17.
- [4] Chew, BP, Park, JS. Carotenoid action on the immune response. *J Nutr* 2004;134:257S-261S.
- [5] Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J Dairy Sci* 2002;85:2173-9.
- [6] Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J* 2005;169:286 –92.
- [7] LeBlanc SJ, Herdt TH, Seymour WM, Duffield TF, Leslie KE. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *J Dairy Sci* 2004;87:609-19.
- [8] Michal JJ, Heirman LR, Wong TS, Chew BP, Frigg M, Volker L. Modulatory effects of dietary β -carotene on blood mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 1994;77:1408 –21.
- [9] Tjoelker LW, Chew BP, Tanaka TS, Daniel LR. Bovine vitamin A and β -carotene intake and lactational status. Responsiveness of peripheral blood polymorphonuclear leukocytes to vitaminA and β -carotene challenge in vitro. *J Dairy Sci* 1988;71:3112–9.

- [10] Chauveau-Duriot B, Thomas D, Portelli J, Doreau M. Carotenoids content in forages: variation during conservation. *Renc Rech Ruminants* 2005;12:117.
- [11] Aréchiga CF, Staples CR, McDowell LR, Hansen PJ. Effects of timed insemination and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *J Dairy Sci* 1998;81:390-402.
- [12] De Ondarza, MB, Wilson JW, Engstrom M. Case study: Effect of supplemental β -carotene on yield of milk and milk components and on reproduction of dairy cows. *Profission Anim Sci* 2009;25:510-6.
- [13] Akordor FY, Stone JB, Walton JS, Leslie KE, Buchanan-Smith JG. Reproductive Performance of Lactating Holstein Cows Fed Supplemental β -Carotene. *J Dairy Sci* 1986;69:2173– 8.
- [14] Bindas, EM, Gwazdauskas, FC, Aiello, RJ, Herbein, JH, McGilliard, ML, Polan, CE. Reproductive and metabolic characteristics of dairy cattle supplemented with β -carotene. *J Dairy Sci* 1984;67:1249-55.
- [15] Folman Y, Ascarelli I, Kraus D, Barash H. Adverse Effect of β -Carotene in Diet on Fertility of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 1987;70:357-66.
- [16] Kaewlamun W, Okouyia M, Humblot P, Techakumphu M, Ponter AA. Does supplementing dairy cows with β -carotene during the dry period affect postpartum ovarian activity, progesterone, and cervical and uterine involution?. *Theriogenology* 2011;75:1029-38.
- [17] Wang, Garcia M, Bisinotto RS, Martinez N, Lima FS, Greco LF, Shin JH, DiCalaça AMM, Ranieri AL, Artiaga BL, Ganda EK, Gomes GC, Becker LFV, Soares SC, Rezende VS, Engstrom MA, Santos JEP, Staples CR. Effect of supplementing vitamin E and β -carotene to prepartum Holstein cattle on health and reproductive responses. *J Anim Sci* 2013;91:E-Suppl. 2/*J Dairy Sci* 2013;96:E-Suppl. 1, W76.
- [18] Kawashima C, Kida K, Schweigert FJ, Miyamoto A. Relationship between plasma carotene concentration during the peripartum period and ovulation of the first follicular wave postpartum in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2009;111:105–11.

- [19] Schweigert FJ, Enjalbert F, Mothes R, Hurtienne A, Immig I. Cooperative European study for the validation of a novel cow-side β -carotene assay in serum and blood. In: Proceedings of 13th International Conference on Production Disease in Farm Animals, Leipzig, Germany, 2007. p. 162.
- [20] Heuer C, Schukken YH, Dobbelaar P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *J Dairy Sci* 1999;82:295–304.
- [21] Jonhston LA, Chew BP. Peripartum Changes of Plasma and Milk Vitamin A and β -Carotene among Dairy Cows with or without Mastitis. *J Dairy Sci* 1984;67:1832-40.
- [22] Chawla R, Kaur H. Plasma antioxidant vitamin status of periparturient cows supplemented with α -tocopherol and β -carotene. *Anim Feed Sci Technol.* 2004;114:279-85.
- [23] Goff JP, Kimura K, Horst RL. Effect of Mastectomy on Milk Fever, Energy, and Vitamins A, E, and β -Carotene Status at Parturition. *J Dairy Sci* 2002;85:1427-36.
- [24] Kaewlamun W, Okouyi M, Humblot P, Remy D, Techakumphu M, Duvaux-Ponter C, Ponter AA. Effects of a dietary supplement of β -carotene given during the dry period on milk production and circulating hormones and metabolites in dairy cows. *Rev Med Vet* 2012;163:235-41.
- [25] Oldham, ER, Eberhart RJ, Muller LD. Effects of supplemental vitamin A or β -carotene during the dry period and early lactation on udder health. *J Dairy Sci* 1991;74:3775-81.
- [26] Patton, RA. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *J Dairy Sci* 2010;93:2105-118.
- [27] Robinson, PH. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livest Sci* 2010;127:115-26.

[28] Kawashima C, Nagashima S, Sawada K, Schweigert FJ, Miyamoto A, Kida K.

Effect of β -Carotene Supply During Close-up Dry Period on the Onset of First

Postpartum Luteal Activity in Dairy Cows. *Reprod Domest Anim* 2010;45:e282-7.

[29] Bian SB, Elliott R, Immig I, Sun DF. The influence of beta-carotene supplementation on post-partum disease and subsequent reproductive performance of dairy cows in China. *J Anim Feed Sci* 2007;16:suppl. 2:370-5.

[30] Chew BP, Hollen LL, Hillers JK, Herlugson ML. Relationship between vitamin A and β -carotene in blood plasma and milk and mastitis in Holsteins. *J Dairy Sci* 1982;65:2111-8.

[31] Arias E, Gonza A, Shimada A, Varela-Echavarria A, Ruiz-Lo F, During A, Mora

O. β -Carotene is incorporated or mobilized along with triglycerides in bovine adipose

tissue in response to insulin or epinephrine. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2009;93:83-93.

[32] Patterson DSP. Plasma carotenoids and fat mobilization in stall-fed cattle. *Nat Commun* 1965;206:1069.

Table 1. Number of observations used for analysis of response variables on treatments Control and Beta-carotene, for primiparous (Prim) and multiparous (Mult) cows.

	Control		Beta-carotene	
	Prim	Mult	Prim	Mult
Calving to 1 st estrous	33	97	33	91
Calving to 1 st service	31	94	29	87
Calving to conception	31	94	29	87
Colostrum density	31	95	26	97
Conception at 1 st service	30	84	28	74
Day of peak	30	69	29	70
Difficult calvings	32	107	33	106
Linear SCC	33	95	32	89
Mastitis	33	95	32	89
Metritis	31	94	31	87
Milk	30	69	29	70
Milk %Fat/%Prot	31	89	31	84
Milk Fat%	31	89	31	84
Milk Protein%	31	89	31	84
P4>1ng/mL at 21d	23	86	29	83
P4>1ng/mL at 42d	28	83	31	78
Peak	30	69	29	70
Blood beta-carotene, day 0	33	109	33	108
Blood beta-carotene, day -15	20	41	18	46
Blood beta-carotene, day 56	29	75	31	73
Blood beta-carotene, day 7	30	95	32	103
Pregnancy at 150d	31	94	29	87
Pregnancy at 90d	33	98	33	91
Time post-calving of placenta release	33	107	32	106

Table 2. Proportion of cows with blood beta-carotene content High (≥ 3.5 $\mu\text{g/mL}$), Intermediate (≥ 2 to < 3.5 $\mu\text{g/mL}$) or Low (< 2 $\mu\text{g/mL}$) at Days 0 and -15 pre-calving, and at Days 7 and 56 post-calving, on treatments Control or Beta-carotene.

	Control	Beta-carotene	Est ¹	SE ²	95% CI ³		P
Day 0 ⁴							
High	28.2	29.1	-0.04	0.26	-0.56	0.47	0.87
Intermediate	66.9	64.5	0.10	0.25	-0.39	0.60	0.68
Low	4.9	6.4	-0.27	0.52	-1.33	0.74	0.60
Day -15 ⁵							
High	4.92	48.4	-2.93	0.65	-4.41	-1.80	<0.01
Intermediate	49.2	45.3	0.83	0.37	0.12	1.57	0.02
Low	45.9	6.3	2.68	0.59	1.62	3.98	<0.01
Day 7							
High	0.8	5.2	-1.91	1.08	-4.85	-0.17	0.08
Intermediate	23.2	45.9	-1.03	0.27	-1.58	-0.51	<0.01
Low	76.0	48.9	1.20	0.27	0.67	1.74	<0.01
Day 56							
High	3.8	9.6	-0.98	0.61	-2.30	0.15	0.11
Intermediate	59.6	63.5	-0.16	0.29	-0.72	0.40	0.57
Low	36.5	26.9	0.45	0.30	-0.14	1.04	0.14

¹Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Control is zero. ²Standard error of the estimate. ³Profile likelihood 95% confidence intervals. ⁴29.1 \pm 6.9 days pre-calving. ⁵15.0 \pm 2.4 days pre-calving.

Table 3. Blood beta-carotene content ($\mu\text{g/mL}$) at Days 0 and -15 pre-calving, and at Days 7 and 56 post-calving, for primiparous (Prim) and multiparous (Mult) cows on treatments Control or Beta-carotene.

	Control		Beta-carotene		SEM	Parity ¹	Treat ¹	Parity x Treat ¹
	Prim	Mult	Prim	Mult				
Day 0 ²	2.71	3.33	2.73	3.19	0.113	0.01	0.59	0.52
Day -15 ³	2.51	2.73	3.19	3.33	0.283	0.51	<0.01	0.71
Day 7	1.55	1.71	2.02	2.08	0.104	0.32	<0.01	0.64
Day 56	2.26	2.29	2.38	2.54	0.094	0.30	0.06	0.50

¹Probability values for the effects of parity, treatment and the interaction of parity and treatment. ²29.1 \pm 6.9 days pre-calving. ³15.0 \pm 2.4 days pre-calving.

Table 4. Milk somatic cell score, colostrum density, and milk yield and solids content for primiparous (Prim) and multiparous (Mult) cows on treatments Control or Beta-carotene.

	Control		Beta-carotene		SEM	Parity ¹	Treat ¹	Parity x Treat ¹
	Prim	Mult	Prim	Mult				
Linear SCS ² , 1 to 9	2.18	3.43	2.31	3.09	0.334	<0.01	0.77	0.50
Colostrum density, g/L	1056	1056	1053	1057	1.9	0.30	0.54	0.31
Milk %Fat/%Prot	1.25	1.34	1.19	1.32	0.042	0.01	0.44	0.65
Milk Fat, %	3.65	3.78	3.54	3.87	0.109	0.04	0.95	0.38
Milk Protein, %	2.94	2.85	2.97	2.95	0.037	0.12	0.09	0.36
Milk ³ , kg	3105	3667	3104	3522	71.2	<0.01	0.32	0.33
Peak ⁴ , kg	45.5	53.5	46.7	52.9	0.93	<0.01	0.79	0.34
Day of peak ⁵ , d	75.3	61.9	71.3	68.0	3.65	0.03	0.78	0.18

¹Probability values for the effects of parity, treatment and the interaction of parity and treatment. ²Linear somatic cell score. ³Milk yield from days 20 to 109 of lactation. ⁴Maximum daily yield. ⁵Day of the maximum yield.

Table 5. Proportion of health and reproductive events for primiparous cows on treatments Control or Beta-carotene.

	Control	Beta-carotene	Est ¹	SE ²	95% CI ³		P
Difficult calvings, %	18.8	24.2	-0.33	0.61	-1.56	0.86	0.59
Mastitis ⁴ , %	12.1	15.6	-0.29	0.72	-1.78	1.13	0.68
Metritis ⁵ , %	6.5	9.7	-0.44	0.95	-2.52	1.43	0.64
Milk %Fat/%Prot > 1.5 ⁶ , %	22.6	6.4	1.44	0.84	-0.08	3.40	0.08
P4>1ng/mL at 21d ⁷ , %	21.7	13.8	0.55	0.74	-0.90	2.07	0.46
P4>1ng/mL at 42d ⁷ , %	35.7	29.0	0.31	0.56	-0.79	1.42	0.58
Conception at 1 st service, %	50.0	42.9	0.29	0.53	-0.75	1.34	0.59
Pregnancy at 90d ⁸ , %	42.4	39.4	0.13	0.50	-0.86	1.12	0.80
Pregnancy at 150d ⁸ , %	60.6	57.6	0.13	0.50	-0.86	1.12	0.80

¹Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Control is zero. ²Standard error of the estimate. ³Profile likelihood 95% confidence interval. ⁴Cows with SCC > 200,000/mL at first test 30.1±8.3 days post-calving. ⁵Purulent secretion or presence of liquid in uterus at ultrasound exam 40.8±9.7 days post-calving. ⁶Ratio of milk fat content to milk protein content at first test 31.3±9.6 days post-calving. ⁷Blood progesterone content > 1ng/mL at 21 and 42 days post-calving. ⁸Cows pregnant at 90 and 150 days post-calving.

Table 6. Proportion of health and reproductive events for multiparous cows on treatments Control or Beta-carotene.

	Control	Beta-carotene	Est ¹	SE ²	95% CI ³		P
Difficult calvings, %	25.2	18.9	0.37	0.33	-0.28	1.04	0.26
Mastitis ⁴ , %	38.9	28.1	0.49	0.32	-0.12	1.12	0.12
Metritis ⁵ , %	31.9	35.6	-0.17	0.31	-0.79	0.45	0.60
Milk %Fat/%Prot > 1.5 ⁶ , %	29.2	30.9	-0.08	0.33	-0.73	0.56	0.80
P4>1ng/mL at 21d ⁷ , %	17.4	25.3	-0.47	0.38	-1.23	0.27	0.21
P4>1ng/mL at 42d ⁷ , %	33.7	38.5	-0.21	0.33	-0.85	0.44	0.81
Conception at 1 st service, %	27.4	33.8	-0.30	0.35	-0.99	0.38	0.38
Pregnancy at 90d ⁸ , %	28.2	28.2	-0.04	0.34	-0.71	0.63	0.91
Pregnancy at 150d ⁸ , %	40.0	40.9	-0.04	0.30	-0.63	0.55	0.90

¹Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Control is zero. ²Standard error of the estimate. ³Profile likelihood 95% confidence interval. ⁴Cows with SCC > 200,000/mL at first test 27.3±8.1 days post-calving. ⁵Purulent secretion or presence of liquid in uterus at ultrasound exam 39.7±8.5 days post-calving. ⁶Ratio of milk fat content to milk protein content at first test 29.6.4±8.3 days post-calving. ⁷Blood progesterone content > 1ng/mL at 21 and 42 days post-calving. ⁸Cows pregnant at 90 and 150 days post-calving.

Table 7. Blood beta-carotene content ($\mu\text{g/mL}$) at 7 and 56 days post-calving according to events (+ = occurrence; - = nonoccurrence).

	Day 7		Day 56		SEM	Event ¹	Day ¹	Event*Day ¹
	+	-	+	-				
Difficult calvings	1.84	1.93	2.42	2.39	0.083	0.48	<0.01	0.36
Retained placenta	1.87	1.90	2.33	2.38	0.082	0.66	<0.01	0.92
Milk %Fat/%Prot > 1.5 ²	1.96	1.90	2.55	2.31	0.091	0.13	<0.01	0.37
Metritis ³	1.89	1.88	2.36	2.36	0.080	0.99	<0.01	0.91
Mastitis ⁴	1.67	1.96	2.08	2.44	0.080	<0.01	<0.01	0.69
P4>1ng/mL at 21d ⁵	2.14	1.84	2.39	2.34	0.092	0.07	<0.01	0.20
P4>1ng/mL at 42d ⁵	2.02	1.82	2.40	2.32	0.081	0.10	<0.01	0.49
Conception at 1 st service	2.01	1.84	2.53	2.28	0.079	0.01	<0.01	0.56
Pregnancy at 90d ⁶	1.96	1.85	2.48	2.25	0.081	0.01	<0.01	0.79
Pregnancy at 150d ⁶	2.05	1.82	2.49	2.30	0.079	0.04	<0.01	0.44

¹Probability values for the effects of event, day, and the interaction of event and day.

²Ratio of milk fat content to milk protein content at first test 31.3±9.6 days post-calving.

³Purulent secretion or presence of liquid in uterus at ultrasound exam 40.1±9.2 days post-calving. ⁴Cows with SCC > 200,000/mL at first test 29.1±8.3 days post-calving.

⁵Blood progesterone content > 1ng/mL at 21 and 42 days post-calving. ⁶Cows pregnant at 90 and 150 days post-calving.

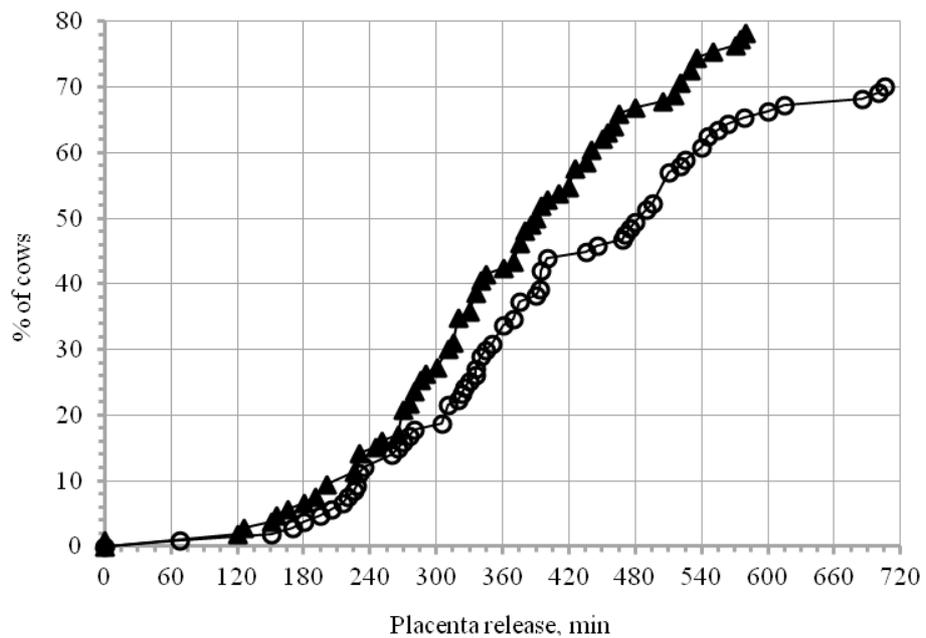


Figure 1. Survival curve for time post-calving of placenta release for multiparous cows on treatments Control (O) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 392min (340 to 440) for Beta-carotene and 490min (395 to 540) for Control. LogRank $P=0.05$ and Wilcoxon $P=0.04$.

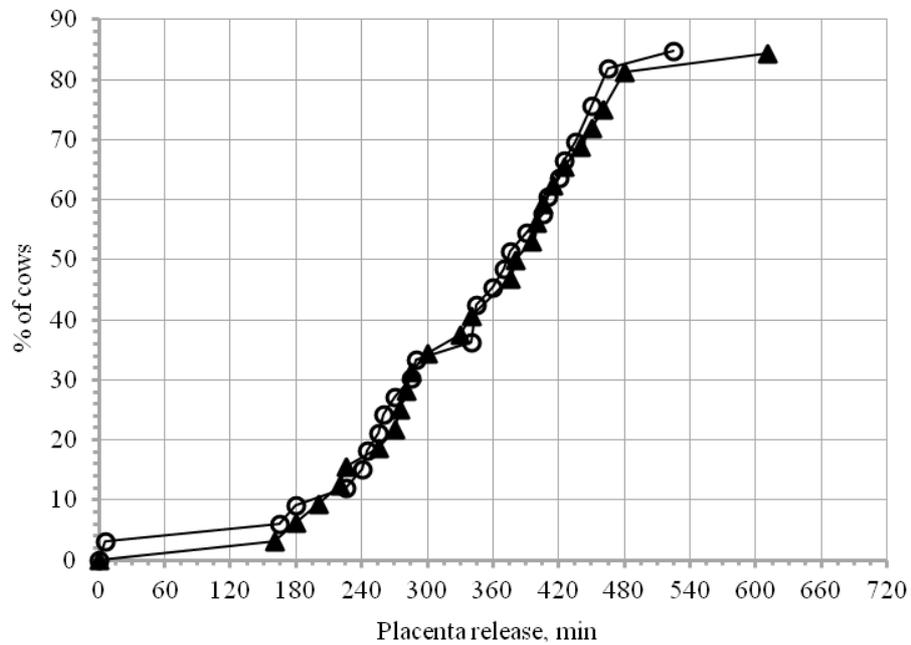


Figure 2. Survival curve for time post-calving of placenta release for primiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 388min (285 to 440) for Beta-carotene and 375min (290 to 425) for Control. LogRank $P=0.87$ and Wilcoxon $P=0.86$.

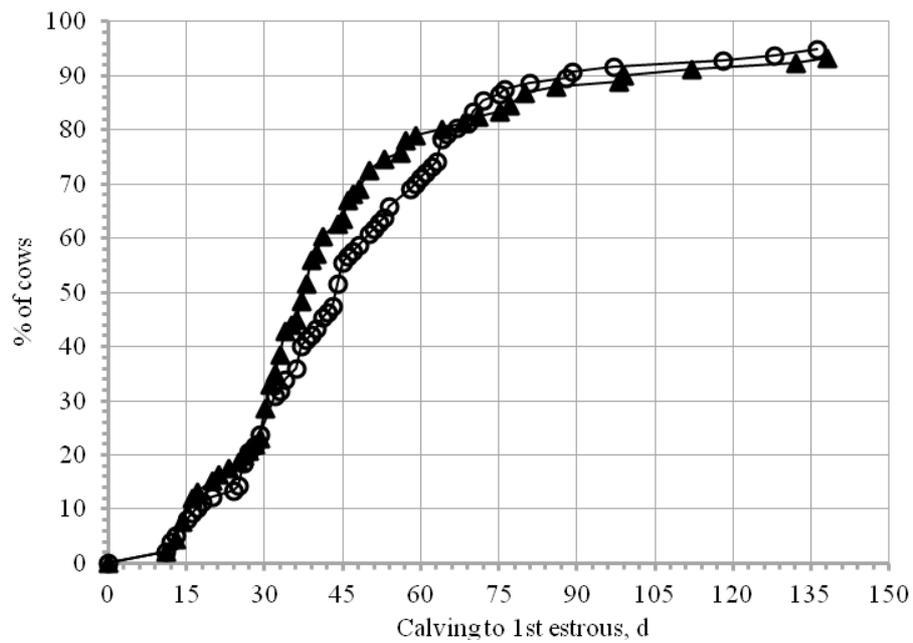


Figure 3. Survival curve for calving to 1st estrous for multiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 38d (34 to 43) for Beta-carotene and 44d (37 to 50) for Control. LogRank $P=0.55$ and Wilcoxon $P=0.23$.

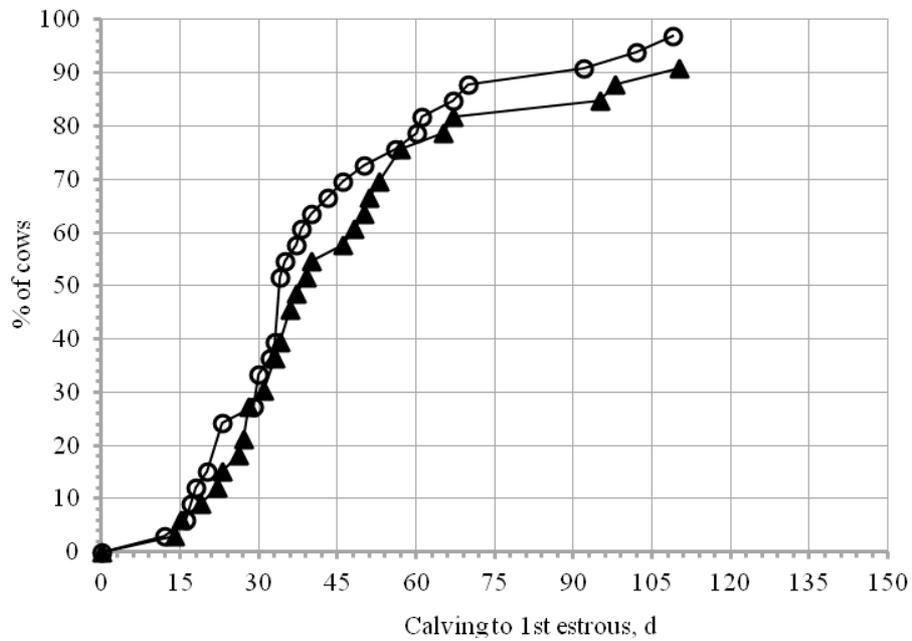


Figure 4. Survival curve for calving to 1st estrous for primiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 39d (33 to 51) for Beta-carotene and 34d (30 to 43) for Control. LogRank $P=0.34$ and Wilcoxon $P=0.42$.

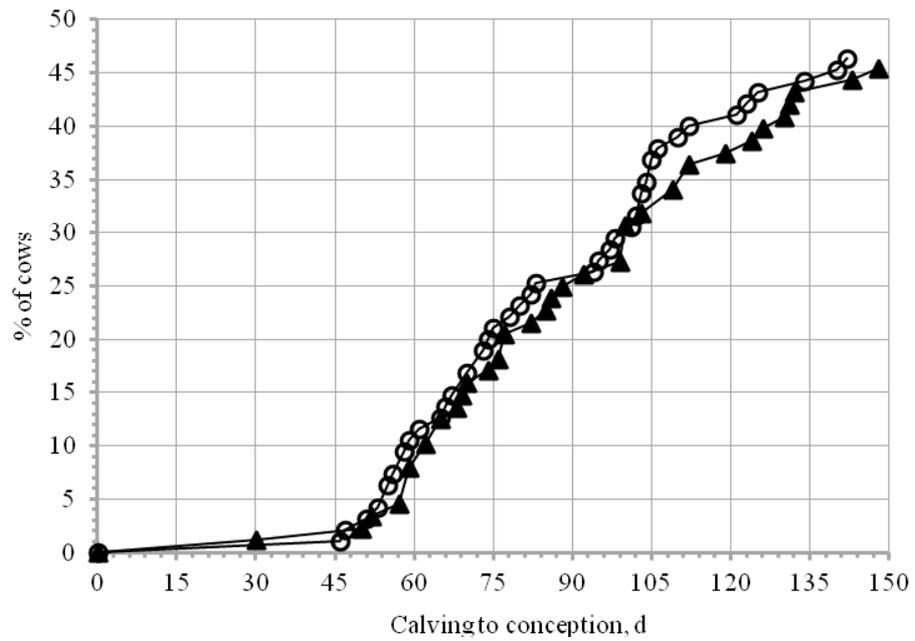


Figure 5. Survival curve for calving to conception for multiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). LogRank $P=0.82$ and Wilcoxon $P=0.75$.

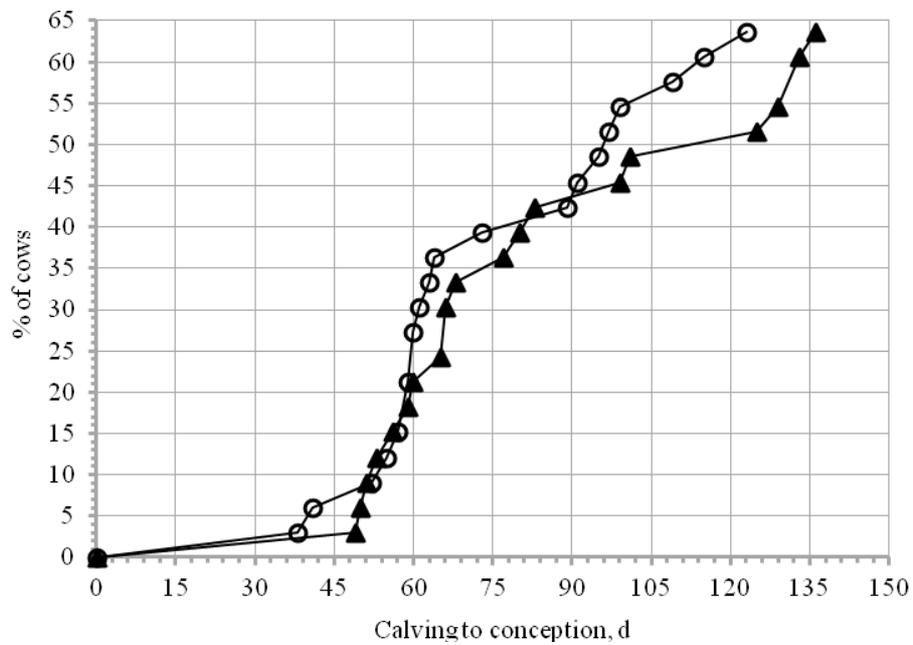


Figure 6. Survival curve for calving to conception for primiparous cows on treatments Control (O) or Beta-carotene (▲). Median was 125d for Beta-carotene and 97d for Control. LogRank $P=0.77$ and Wilcoxon $P=0.65$.

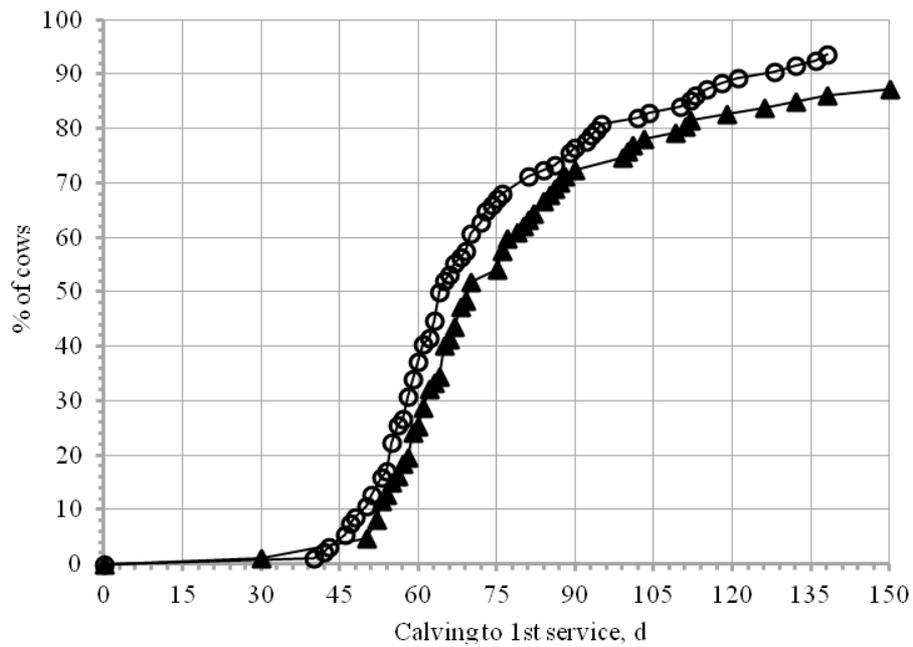


Figure 7. Survival curve for calving to 1st service for multiparous cows on treatments Control (O) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 70d (65 to 79) for Beta-carotene and 64d (61 to 70) for Control. LogRank $P=0.09$ and Wilcoxon $P=0.07$.

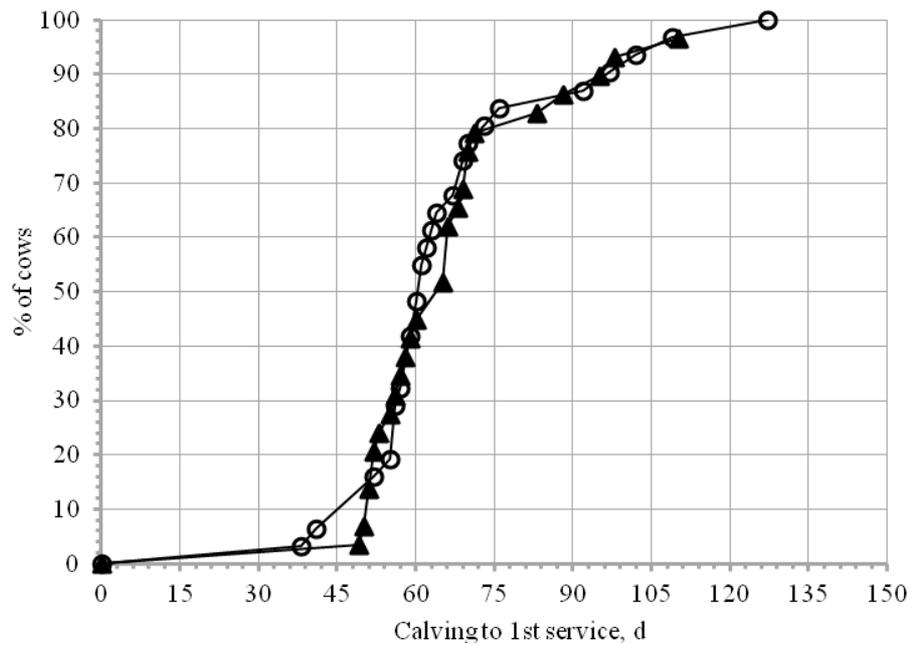


Figure 8. Survival curve for calving to 1st service for primiparous cows on treatments Control (○) or Beta-carotene (▲). Median and 95% confidence interval were 65d (56 to 69) for Beta-carotene and 61d (57 to 67) for Control. LogRank $P=0.73$ and Wilcoxon $P=0.87$.