



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de los frutos de *Acacia farnesiana* en la
dieta caprina: presencia de compuestos
bioactivos y actividad antioxidante de la leche**

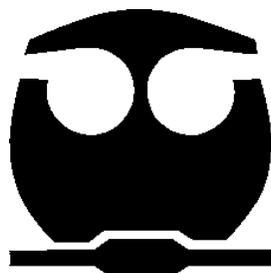
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

Amairani Ramírez Rodríguez



Ciudad Universitaria, CDMX., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	M. en C.: Cornejo Barrera Lucía
VOCAL	Dr.: Navarro Ocaña Arturo
SECRETARIO	Dra.: Delgadillo Puga Claudia
1^{er} SUPLENTE	M. en C.: Gómez Sierra Tania
2° SUPLENTE	M. en C.: Sánchez Chinchillas Argelia

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Nutrición Animal “Dr. Fernando Pérez-Gil Romo”.

Red de Apoyo a la Investigación, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Laboratorio 321, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio 209, Departamento de Biología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Claudia Delgadillo Puga

SUSTENTANTE:

Amairani Ramírez Rodríguez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por darme las herramientas para mi formación académica.

Al Departamento de Nutrición Animal “Dr. Fernando Pérez-Gil Romo” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por aceptarme para realizar el proyecto.

A el apoyo económico del proyecto PAPIIT-UNAM IN220015.

A la Dra. Claudia Delgadillo Puga por confiar en mi capacidad para trabajar en su proyecto y por todos los conocimientos que me transmitió, por su paciencia y su compromiso conmigo para que cumpliera todos mis objetivos.

A los miembros del jurado por su ayuda a la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Marcela Álvarez por su apoyo al proyecto.

Al Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química y al Dr. Arturo Navarro Ocaña porque me permitió trabajar en su laboratorio y me brindo las herramientas necesarias para la realización del proyecto.

Al Departamento de Biología de la Facultad de Química, al Dr. José Pedraza Chaverri y al M.en C. Omar Noel Medina Campos por su apoyo y paciencia, por brindarme las herramientas necesarias para la realización del proyecto.

A la granja Oly y a la granja Puma por permitir realizar el proyecto con sus cabras.

A la Escuela de Ciencias Biológicas de Instituto Politécnico Nacional por la colaboración para la liofilización de las muestras de leche.

A la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) del INCMNSZ por permitir el uso del equipo HPLC y sus instalaciones.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología del INCMNSZ

Dedicatorias

A mi mama Griselda por todo su apoyo, amor, comprensión y sobretodo su paciencia, por siempre creer en mí, animarme y ayudarme a seguir siempre con la mejor actitud.

A mis abuelitos Ofe y Toño por su cariño y cuidados, gracias por siempre procurarme.

A mi abuelito Jorge por su apoyo y cariño.

A mis tíos Karina y Manuel por sus enseñanzas y por siempre brindarme las puertas de su casa cuando necesitaba momentos de descanso y a mis primos José Manuel y Carlos por todo su cariño.

A mi tío Antonio por animarme y enseñarme que se vale divertirse.

A mi hermano por sus amor, comprensión y sobretodo su paciencia.

Índice General

	Resumen	1
I	Introducción	3
II	Antecedentes	5
II.1	Oxidación	5
II.1.1	Radicales libres	5
II.1.2	Especies reactivas de oxígeno (ERO)	6
II.1.3	Daño oxidativo y estrés oxidante	7
II.2	Compuestos bioactivos (CB)	8
II.2.1	Compuestos fenólicos	9
II.2.1.1	Ácidos fenólicos	10
II.2.1.2	Ácidos hidroxicinámicos	10
II.2.1.3	Ácidos hidroxibenzoicos	11
II.2.1.3	Taninos	11
II.2.1.4	Flavonoides	12
II.3	Antioxidante	16
II.4	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd	18
II.4.1	<i>Acacia farnesiana</i> como recurso forrajero no convencional	19
II.4.2	<i>Acacia farnesiana</i> , (L.) Willd como fuente de compuestos bioactivos	20
II.5	Localización de compuestos bioactivos en leguminosas	22

II.5.1	Efecto de los compuestos bioactivos en leguminosas para la adquisición de nutrimentos	23
II.5.2	Biosíntesis de compuestos bioactivos en las leguminosas	25
II.5.2.1	Biosíntesis de los flavonoides	25
II.5.2.2	Biosíntesis de isoflavonoides	26
II.5.2.3	Biosíntesis de flavonoles	27
II.5.2.4	Biosíntesis de flavonas	27
II.5.2.5	Biosíntesis de antocianinas	27
II.5.2.6	Biosíntesis de proantocianinas	28
II.6	Leche caprina	30
II.6.1	Características generales de la producción caprina en el mundo	30
II.6.2	Características generales de la producción caprina en México	31
II.6.3	Metabolización de compuestos bioactivos en rumiantes	33
II.6.4	Efecto de los compuestos bioactivos sobre los microorganismos del rumen	35
II.6.5	Efecto de los compuestos bioactivos en la absorción de aminoácidos intestinales	37
II.6.6	Características generales de la producción de leche caprina en el mundo	37
II.6.7	Características generales de la producción de leche caprina en México	39
II.6.8	Beneficios de la leche de caprina	42

II.6.9	Factores que interviene en la composición de la leche caprina	43
II.6.10	Compuestos bioactivos en leche caprina	44
II.7	Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu	45
II.8	Cromatografía de capa fina	46
II.9	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	47
II.10	Capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH ⁺)	48
II.11	Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)	51
II.12	Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)	52
III	Objetivos	53
III.1	General	53
III.2	Particulares	53
IV	Justificación	54
V	Hipótesis	55
VI	Materiales y métodos	56
VI.1	Reactivos	56
VI.2	Animales y dietas	56
VI.3	Muestras de leche caprina	59
VI.4	Análisis químico nutricional de la dieta animal	59
VI.5	Análisis químico nutricional de la leche caprina	59
VI.6	Obtención de extractos de la leche caprina	60

VI.7	Cuantificación de polifenoles totales en extractos de leche caprina por el método de Folin-Ciocalteu	60
VI.8	Identificación de compuestos fenólicos de los extractos de leche caprina por cromatografía en capa fina	61
VI.9	Identificación de compuestos en extractos de leche caprina por cromatografía de líquido de alta eficiencia (HPLC)	69
VI.10	Determinación antioxidante cuantitativa de los extractos de leche caprina	63
	a) Capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH ⁺)	63
	b) Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)	63
	c) Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)	65
VI.11	Análisis estadísticos	65
VII.	Resultados	66
VII.1	Análisis químico nutricional de las dietas	66
VII.2	Análisis químico nutricional de la leche caprina	67
VII.3	Obtención de los extractos de leche caprina	68
VII.4	Cuantificación de polifenoles totales en los extractos de leche caprina	69
VII.5	Identificación de compuestos fenólicos en los extractos de la leche caprina por cromatografía de capa fina.....	70
VII.6	Identificación de compuestos químicos en los extractos de leche caprina por HPLC	74

VII.7	Capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH ⁺)	77
VII.8	Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)	78
VII.9	Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)	79
VIII	Discusión	80
VIII.1	Análisis químico nutricional de las dietas	81
VIII.2	Análisis químico nutricional de la leche caprina	81
VIII.3	Obtención de los extractos de leche caprina	82
VIII.4	Cuantificación de polifenoles totales (PT) en los extractos de leche caprina	83
VIII.5	Identificación de compuestos fenólicos en los extractos de la leche caprina por cromatografía de capa fina	86
VIII.6	Identificación de compuestos en extractos de leche caprina por cromatografía de líquido de alta eficiencia (HPLC)	87
VIII.7	Capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH ⁺)	89
VIII.8	Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)	91
VIII.9	Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)	92
IX	Conclusiones	94
X	Bibliografía	95
XI	Anexos	110
Anexo I	Extracción de leche	110

Anexo II	Preparación de disoluciones	111
Anexo III	Preparación de curvas patrón de estándares de ácidos fenólicos y flavonoides para análisis de HPLC	112
Anexo IV	Curvas de calibración	113
Anexo V	Cromatogramas	119

Índice de Cuadros

Cuadro 1	Especies reactivas de oxígeno	7
Cuadro 2	Clasificación de compuestos fenólicos	9
Cuadro 3	Análisis químico nutricional de los frutos de <i>Acacia farnesiana</i>	20
Cuadro 4	Composición química de leche humana y de rumiantes	41
Cuadro 5	Análisis químico nutricional de leche caprina	41
Cuadro 6	Polifenoles totales en diferentes alimentos	45
Cuadro 7	Porcentaje de inhibición del radical DPPH ⁺ en diferentes alimentos ...	49
Cuadro 8	Distribución de los insumos para las dietas experimentales	58
Cuadro 9	Análisis químico nutricional de concentrado comercial, ensilado de maíz y heno de alfalfa	58
Cuadro 10	Condiciones para la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de leche caprina mediante HPLC	62
Cuadro 11	Análisis químico nutricional de las dietas	66
Cuadro 12	Análisis químico nutricional de la leche caprina	67
Cuadro 13	Contenido de polifenoles totales en leche caprina, expresado en diferentes concentraciones	69
Cuadro 14	Tiempos de retención obtenidos por HPLC para estándares	74
Cuadro 15	Concentración de diferentes compuestos bioactivos en leche caprina identificados por HPLC	75
Cuadro 16	Capacidad de absorción del radical oxígeno de los extractos de leche caprina, expresados en diferentes concentraciones	78

Cuadro 17	Capacidad de reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} de los extractos de leche caprina, expresados en diferentes concentraciones	79
-----------	---	----

Índice de Graficas

Grafica 1	Población mundial de cabezas de cabras	30
Grafica 2	Población nacional de cabezas de cabras	32
Grafica 3	Producción mundial de leche caprina	38
Grafica 4	Producción nacional de leche caprina	40
Grafica 5	Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH ⁺ por efecto de la leche caprina	77

Índice de Figuras

Figura 1	Estructura química de ácidos fenólicos	10
Figura 2	Estructuras químicas de ácidos hidroxicinámicos	11
Figura 3	Unidades monoméricas de taninos condensados y taninos hidrolizables	12
Figura 4	Estructuras químicas de flavonoides	15
Figura 5	Sistemas antioxidantes en el estrés oxidativo	17
Figura 6	<i>Acacia farnesiana</i>	18
Figura 7	Mapa de distribución potencial de la especie <i>Acacia farnesiana</i> , (L.) Willd	19
Figura 8	Las diferentes funciones biológicas <i>in situ</i> de las clases específicas de flavonoides y sus compuestos representativos	24
Figura 9	Proceso general de biosíntesis de fenoles	29
Figura 10	Diagrama de flujo esquemático de la digestión de proteína cruda (CP) a partir de forraje que contiene proantocianidinas	34
Figura 11	Representación esquemática de los efectos de las proantocianidinas sobre el metabolismo ruminal y el comportamiento de los rumiantes ..	36
Figura 12	Cabras de la granja PUMA	39
Figura 13	Técnica cromatográfica de capa fina	46
Figura 14	Sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia	48
Figura 15	Varios trayectos de la reacción del radical DPPH ⁺ con ácido gálico (ácido hidroxibenzoico)	50

Figura 16	Reacción de APPH con fluoresceína y un antioxidante	51
Figura 17	Cromatoplaca para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de leche caprina. Placa revelada con luz UV	70
Figura 18	Cromatoplaca para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de leche caprina. Placa revelada con el radical DPPH ⁺	71
Figura 19	Cromatoplaca para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de leche caprina. Placa revelada con cloruro férrico	72
Figura 20	Cromatoplaca para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de leche caprina. Placa revelada con el radical sulfato cérico	73

Figuras de Anexos

Figura 1	Curva de calibración de ácido gálico para determinación de polifenoles totales	113
Figura 2	Curva de calibración de ácido cafeico como estándar de referencia en la determinación de HPLC para ácidos fenólicos	113
Figura 3	Curva de calibración de ácido clorogénico como estándar de referencia en la determinación de HPLC para ácidos fenólicos	114
Figura 4	Curva de calibración de ácido ferúlico como estándar de referencia en la determinación de HPLC para ácidos fenólicos	114
Figura 5	Curva de calibración de ácido gálico como estándar de referencia en la determinación de HPLC para ácidos fenólicos	115
Figura 6	Curva de calibración de catequina como estándar de referencia en la determinación de HPLC para flavonoides	115
Figura 7	Curva de calibración de epicatequina como estándar de referencia en la determinación de HPLC para flavonoides	116
Figura 8	Curva de calibración de quercetina como estándar de referencia en la determinación de HPLC para flavonoides	116
Figura 9	Curva de calibración de Trolox para el ensayo de capacidad de absorción de radical de oxígeno ORAC de los extractos de leche caprina	117
Figura 10	Pérdida de fluorescencia inducida por la adición de AAPH dependiente de la dosis de Trolox de los extractos de leche caprina	117

Figura 11	Curva de calibración de Fe_2SO_4 para el ensayo de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} de los extractos de leche caprina	118
Figura 12	Cromatograma del estándar ácido gálico	119
Figura 13	Cromatograma del estándar ácido cafeico	119
Figura 14	Cromatograma para el estándar ácido ferúlico	119
Figura 15	Cromatograma para el estándar ácido clorogénico	120
Figura 16	Cromatograma para el estándar de catequina	120
Figura 17	Cromatograma para el estándar de epicatequina	120
Figura 18	Cromatograma para el estándar de quercetina	121
Figura 19	Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación en dieta base	121
Figura 20	Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación en pastoreo	122
Figura 21	Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación DB + 10 % de los FAF	122
Figura 22	Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación DB + 20 % de los FAF	123
Figura 23	Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación DB + 30 % de los FAF	123

Cuadros de Anexos

Cuadro 1	Datos obtenidos para la extracción de 30 g de leche caprina liofilizada	110
Cuadro 2	Diluciones para estándares utilizados en la técnica HPLC	112

Resumen

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto de la inclusión creciente de los frutos de *Acacia farnesiana* (FAF) en la alimentación de cabras para identificar la presencia de compuestos bioactivos y determinar la capacidad antioxidante de la leche caprina. Se trabajó con 5 grupos de cabras de la raza Alpina francesa con un tratamiento dietario distinto cada uno, dichos tratamientos fueron: 1, el porcentaje agregado de FAF fue sobre la dieta base. Las muestras de leche se agruparon en los 5 tratamientos mencionados, el análisis del perfil de compuestos bioactivos se realizó a través de la cuantificación de polifenoles totales (PT) por el método de Folin-Ciocalteu, cromatografía de capa fina, y cromatografía de líquidos de alta eficiencia. La actividad antioxidante de la leche se cuantificó a través del atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH⁺), de la capacidad de absorción de los radicales oxígeno (ORAC) y la capacidad para reducir el Fe⁺³ a Fe⁺² en el complejo férrico-2-4-6-tripiridil-5-triazina (TPTZ). El análisis estadístico de la varianza se realizó aplicando la prueba Kruskal-Wallis, además de la comparación de medias a través de la prueba U de Mann-Whitney estableciendo un nivel de significancia de P<0.05. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 18. El contenido de PT presentó una mayor concentración (2.06 mg eq AG/g MS) en la leche de los animales que recibieron 30 % de los FAF, este resultado fue estadísticamente diferente (P<0.05) al resto de los tratamientos. Así mismo, se identificó y cuantificó la presencia de compuestos bioactivos como: los ácidos gálico, clorogénico y ferúlico, además de catequina en la leche de animales alimentados en pastoreo y con la incorporación del 10 %, 20 % y 30 % de los FAF. Sin embargo estos compuestos no fueron identificados en la leche de las hembras alimentadas con la dieta base. En relación a la capacidad de atrapamiento del radical DPPH⁺, todas las muestras de leche caprina presentaron actividad antioxidante; siendo la leche de pastoreo libre, la que registró la mayor actividad. En relación a la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC) y poder antioxidante reductor férrico (FRAP), todos los tipos de leche evaluadas presentaron una importante actividad, sin embargo la leche caprina de animales alimentados con el 30 % de los FAF, registró la mayor capacidad antioxidante. En conclusión la leche caprina de animales alimentados con el 30 % de los FAF y pastoreo libre mostraron mejores resultados en cuanto a concentración de

compuestos bioactivos identificados y actividad antioxidante. De manera contrastante los resultados en la leche de animales alimentados con dieta base, registró una menor concentración de compuestos bioactivos y menor capacidad antioxidante.

I Introducción

La leche es un alimento que proporciona nutrimentos indispensables y es una fuente importante de energía, proteínas de alta calidad y grasas. La leche puede contribuir considerablemente a la ingestión necesaria de nutrientes como el calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B12 y ácido pantoténico. La leche de origen animal puede desempeñar un papel importante en las dietas de los lactantes y niños en poblaciones con bajo nivel de ingestión de grasas y acceso limitado a otros alimentos de origen animal ([Pérez, 2011](#); [FAO, 2017](#)).

La leche de cabra tiene una composición similar a la leche de vaca. En los países del Mediterráneo y en América Latina, la leche de cabra generalmente se transforma en quesos; en África y Asia meridional, se consume generalmente cruda o acidificada ([FAO, 2017](#)). La producción de leche de cabra en México es estacional, el 70 % de los productores alimentan al ganado caprino en sistemas extensivos (pastoreando sobre la vegetación de la región en la que habitan) ([Cuellar et al., 2012](#)).

Existen una serie de árboles y leguminosas arbóreas que han sido estudiadas en diferentes partes del mundo como recursos potenciales para la alimentación animal, en particular en los recursos que pueden ser disponibles sobre todo durante la época de sequía. *Acacia farnesiana*, también conocida como Huizache es una leguminosa arbórea común en las zonas áridas y semiáridas de México que mantiene sus frutos durante la época de sequía que ha sido utilizado como alimentación de rumiantes ([García et al., 2009](#)), se ha reportado la presencia de compuestos bioactivos como quercetina, ácido gálico, glucósidos de flavonoides, metil galato, catequina y epicatequina en esta especie ([Seigler, 2003](#); [Manríquez et al., 2007](#); [Cuchillo et al., 2010](#); [Hannachi et al., 2011](#); [Maldini et al., 2011](#); [RamLi et al., 2011](#); [Sánchez et al., 2013b](#)). Estos compuestos, por su estructura química pueden actuar como antioxidantes.

De acuerdo a [Bernhoft \(2010\)](#) los compuestos bioactivos en las plantas se definen como metabolitos secundarios que pueden provocar efectos farmacológicos y toxicológicos en el hombre y los animales; estos metabolitos son productos asociados a

las rutas metabólicas durante su crecimiento y desarrollo. Aunque sus funciones no se conocen completamente, se dice que protegen a la planta contra insectos, hongos, bacterias y radiaciones UV. Se han identificado más de 5,000 compuestos, que han ido clasificándose en: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos, curcuminoides, saponinas y terpenos, entre otros; algunos de ellos con propiedades antibacteriales, antivirales, fungicidas, antioxidantes y antiinflamatorias principalmente ([Manach *et al.*, 2004](#); [Valares, 2011](#)).

II Antecedentes

II.1 Oxidación

En la química, la oxidación de un compuesto se debe a la pérdida de electrones o de hidrógenos así como la ganancia de oxígeno en una molécula. Los oxidantes tienen afinidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, muchas de ellas de gran importancia biológica tales como proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos (Cárdenas y Pedraza, 2006; Halliwell, 2007a; Quintanar y Calderón, 2009).

II.1.1 Radicales libres

Un radical libre (RL) puede ser definido como cualquier especie molecular capaz de existir independientemente, que contenga uno o más electrones desapareados (que ocupan por sí mismos un orbital atómico o molecular). La presencia de un electrón desapareado da lugar a ciertas propiedades comunes que son compartidas por la mayoría de los radicales. Muchos radicales son inestables y altamente reactivos. Pueden donar un electrón o aceptar un electrón de otras moléculas, por lo tanto se comportan como oxidantes o reductores (Cárdenas y Pedraza, 2006; Lobo *et al.*, 2010). Los objetivos de los radicales libres incluyen todo tipo de moléculas en el cuerpo, como pueden ser los lípidos, ácidos nucleicos y las proteínas (Lobo *et al.*, 2010). La mayor parte de los compuestos químicos de importancia biológica están formados por átomos unidos por enlaces covalentes, en estos enlaces dos átomos comparten un par de electrones en un orbital molecular y cada electrón muestra una rotación o giro opuesto a su par. En las células se llevan a cabo reacciones químicas que rompen estos enlaces de manera heterolítica, haciendo que una de las partes conserve dos electrones y la otra tenga deficiencia de dos electrones, lo cual genera compuestos estables nucleofílicos o electrofílicos, respectivamente, que son los conocidos aniones y cationes. Sin embargo, algunas reacciones químicas, las radiaciones electromagnéticas y otros factores, pueden romper estos enlaces de la forma llamada homolítica, proceso después del cual cada parte conserva un solo electrón que estará desapareado, generándose así las especies químicas llamadas radicales libres. Los RL son muy

reactivos por que tienden a reducirse, esto se refiere a que sustraen un electrón de átomos o moléculas estables, las cuales son oxidadas, con la finalidad de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido un electrón de otra molécula; ésta (pierde al electrón) se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose la reacción, dando como resultado una reacción en cadena ([Avello y Suwalsky, 2006](#); [Quintanar y Calderón, 2009](#)).

II.1.2 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Es el término que se le da a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. Los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en el equilibrio homeostático ([Avello y Suwalsky, 2006](#)), estas ERO son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al organismo mediante reacciones bioquímicas de óxido-reducción, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por factores patológicos ([Quintanar y Calderón, 2009](#)).

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (O_2) con la formación de agua y sin la producción de intermediarios dañinos, mientras que un pequeño porcentaje (en torno al 5 %) generan RL. Los oxidantes pueden también proceder del exterior, ya sea directamente o como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias ([Avello y Suwalsky, 2006](#)).

La expresión “especies reactivas de oxígeno” es un término colectivo que involucra no sólo los RL derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno, y que además son muy reactivos, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl).

Cuadro 1. Especies reactivas de oxígeno

Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Oxígeno singulete (1O_2)
Radical hidroxilo ($\bullet OH$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Peroxilo ($ROO\bullet$)	Ozono (O_3)
Alcoxilo ($RO\bullet$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Peroxilo lipídico ($LOO\bullet$)	Ácido nitroso (HNO_2)
Peroxinitrito ($ONOO^-$)	Trióxido de dinitrógeno (N_2O_3)
Óxido nítrico ($NO\bullet$)	Peróxido lipídico ($LOOH$)

(Cárdenas y Pedraza, 2006; Pham *et al.*, 2008).

II.1.3 Daño oxidativo y estrés oxidante

En las células y en los organismos en condiciones normales se mantiene un balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con los sistemas antioxidantes; de tal manera que la toxicidad por oxidación es limitada, pero cuando este equilibrio se pierde es debido a una excesiva producción de ERO o una deficiencia de los mecanismos antioxidantes, lo que conlleva a daños en las moléculas (Cárdenas y Pedraza, 2006; Quintanar y Calderón, 2009). Muchas de estas moléculas deben ser reparadas (tal como el ADN) o incluso reemplazadas (tal como muchos tipos de proteínas oxidadas). Así, por ejemplo, algunas proteínas en cuya estructura se encuentra el grupo prostético hierro-azufre (Fe-S) importantes para el metabolismo de *E. coli* pueden ser dañadas por los niveles de 0.1 a 0.2 μM de $O_2^{\bullet-}$.

Como se mencionó el “estrés oxidativo” es causado por la pérdida del balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes. En esta situación se presentan daños de las macromoléculas por el rompimiento o modificación de su estructura, trayendo como consecuencia una alteración en la función o incluso, la muerte de la célula. El estudio del estrés oxidativo ha cobrado considerable importancia debido a las consecuencias que puede tener en la salud. También se ha observado que diversos factores ambientales, como los contaminantes en el aire y la radiación pueden favorecer el desbalance oxidante/antioxidante (Cárdenas y Pedraza, 2006; Quintanar y Calderón, 2009).

El daño oxidativo está definido como "El daño biomolecular causado por el ataque de las especies reactivas sobre los constituyentes de organismos vivos". Los niveles elevados de daño oxidativo pueden resultar no sólo del estrés oxidativo, sino también de la falla de los sistemas de reparación o reemplazo (Halliwell, 2007b; Quintanar y Calderón, 2009). Algunas enfermedades inflamatorias y psicológicas, además del envejecimiento están relacionadas con este fenómeno (Gilbert y Colton, 1999).

II.2 Compuestos bioactivos (CB)

Los compuestos bioactivos también denominados fitoquímicos se encuentran en las plantas, son metabolitos secundarios asociados a las rutas metabólicas de su crecimiento y desarrollo; aunque sus funciones no se conocen completamente, se dice que la mayoría cumplen funciones de defensa dentro de la planta, pueden tener efectos farmacológicos y toxicológicos en el ser humano y animales (Manach *et al.*, 2004; Bernhoft, 2010; Muñoz *et al.*, 2010), no son esenciales para el crecimiento y el desarrollo, pero se ha demostrado que intervienen en los procesos biológicos, teniendo por lo tanto un impacto sobre las funciones del organismo y sobre la salud. La actividad más conocida y estudiada de los CB es su capacidad antioxidante; además, estos compuestos presentan actividad antiinflamatoria y pueden actuar como reguladores de genes implicados en procesos inflamatorios, neurodegenerativos y cancerígenos, entre otros (Manach *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2010; Valares, 2011; Zervas y Tsiplakou, 2011). Los CB pueden clasificarse de diferentes maneras, generalmente se clasifican por sus elementos estructurales y son: compuestos fenólicos, compuestos azufrados, terpenoides y fibra (Manach *et al.*, 2004).

II.2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos muestran una gran diversidad de estructuras, que van desde moléculas simples (vainillina, ácido gálico, ácido cafeico) a polifenoles tales como estilbenos, flavonoides y polímeros derivados de estos diversos grupos. El término polifenol se utiliza como sinónimo de compuestos fenólicos, pero debe ser restringido a moléculas que llevan al menos dos anillos fenólicos. Algunos compuestos fenólicos están muy distribuidos mientras que otros son específicos de ciertas plantas familias o solo se encuentran en ciertas etapas de desarrollo de la planta (Cheynier, 2012).

Se pueden clasificar en diferentes grupos en función al número de anillos de fenol que contiene y de los elementos estructurales que unen entre sus anillos (Manach *et al.*, 2004).

Cuadro 2. Clasificación de compuestos fenólicos

Clasificación	Estructura de acuerdo al número de grupos fenol (C ₆) y enlaces carbono(-C _n)
Fenoles simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁
Ácidos fenilacéticos, acetofenoles	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinámico, isocumarina	C ₆ -C ₃
Naftoquinona	C ₆ -C ₄
Xantanos	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbeno, antraquinona	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides, isoflavonas	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanós, neolignano	(C ₆ -C ₃) ₂
Bioflavonoides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Melanoidinas	(C ₆) _n
Taninos	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

(Muñoz *et al.*, 2010).

II.2.1.1 Ácidos fenólicos

Existen 2 clases de ácidos fenólicos: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Los ácidos hidroxibenzoicos son compuestos de estructuras complejas tales como taninos hidrolizables (TH) y taninos condensados (TC). Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los hidroxibenzoicos y consisten principalmente en ácido p-cumárico, ferúlico, cafeico y sinápico (Manach *et al.*, 2004).

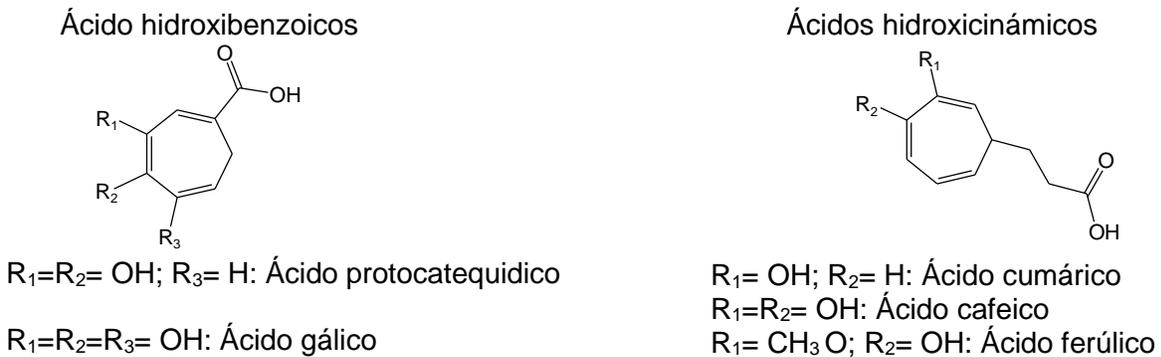


Figura 1. Estructura química de ácidos fenólicos.

II.2.1.2 Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en forma libre, excepto en alimentos procesados que han sido congelados, esterilizados o fermentados. Las formas unidas son derivados glicosilados o ésteres de ácido quínico, ácido shiquímico y ácido tartárico. El ácido cafeico y quínico se combinan para formar ácido clorogénico, que se encuentra en muchos tipos de fruta y en altas concentraciones en el café.

El ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante que se encuentra en los granos de cereales, que constituyen su principal fuente alimentaria. El contenido en ácido ferúlico del grano de trigo es de 0.8 a 2.0 g/kg de peso seco, que puede representar hasta un 90 % de los polifenoles totales. El ácido ferúlico se encuentra principalmente en las partes externas del grano. La capa de aleurona y el pericarpio de grano de trigo contienen el 98 % del ácido ferúlico total. Las harinas de arroz contienen aproximadamente la misma cantidad de ácidos fenólicos que la harina de trigo (63

mg/kg), aunque el contenido de la harina de maíz es aproximadamente tres veces superior (Manach *et al.*, 2004).

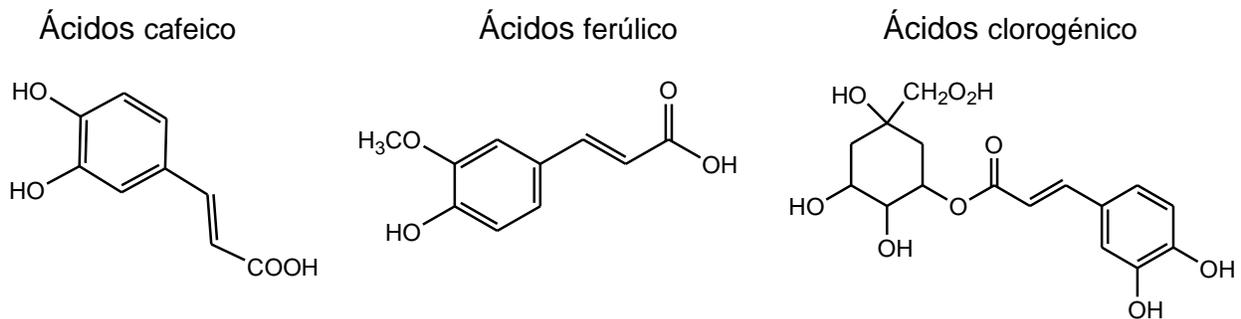


Figura 2. Estructuras químicas de ácidos hidroxicinámicos.

II.2.1.3 Ácidos hidroxibenzoicos

II.2.1.3 Taninos

Son polímeros polifenólicos solubles en agua, de alto peso molecular y tiene capacidad para formar complejos principalmente con proteínas debido a la presencia de un gran número de grupos hidroxilo y fenólicos, se encuentran en árboles forrajeros, arbustos, legumbres, frutas, cereales y granos (Jonker y Yu, 2017).

Los TH son complejas moléculas con un poliol como grupo central tal como, glucosa, glucitol, ácido quínico, quercitol o ácido shiquímico que es parcial o totalmente esterificado con un grupo fenólico, es decir, ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico; galotaninos) o un regulador de ácido gálico hexahidroxidifénico. Los últimos grupos fenólicos resultantes pueden esterificarse o oxidarse para producir TH más complejos.

Los TC o también conocidos como proantocianidinas son principalmente polímeros de las unidades de flavan-3-ol (epi) catequina y (epi) galocatequina, que están unidas por enlaces interflavonoides C4-C8 y C4-C6, el número de unidades monoméricas puede variar y esto determina el grado de polimerización de di-, tri-, tetraflavonoides a oligómeros superiores (Patra y Saxena, 2010). Las interacciones con las proteínas se dan por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (OH) de

proantocianidina (TC) y el grupo amino (-NH) de péptidos u otros sustratos, también se deben a interacciones hidrofóbicas entre el anillo de fenol de proantocianidina y el grupo carboxilo (-COOH) de proteína. Las proantocianidinas también pueden unirse a metales, aminoácidos esenciales, hidratos de carbono, enzimas digestivas y microorganismos, pero con una menor afinidad que con las proteínas de la dieta (Jonker y Yu, 2017).

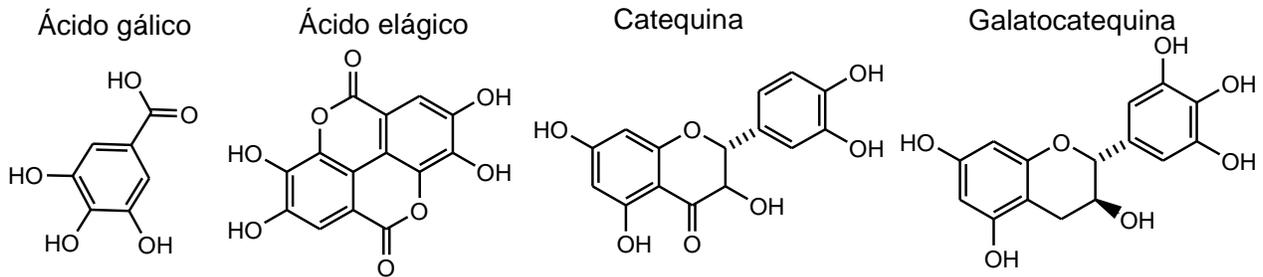


Figura 3. Unidades monómericas de taninos condensados (catequina y galocatequina) y taninos hidrolizables (ácido gálico y elágico).

II.2.1.4 Flavonoides

Los flavonoides constituyen una clase diversa de metabolitos que están ubicuamente presentes en el reino vegetal, contienen más de 10,000 estructuras diferentes. El nombre *flavonoid* se deriva de la palabra latina amarillo, *flavus*, y apunta al color de muchos flavonoides. Los flavonoides son responsables de gran parte de la pigmentación amarilla, roja, azul y morada de las plantas (Gholami *et al.*, 2014). El hombre los consume cotidianamente en la dieta, ya que están presentes en las frutas rojas como las moras, fresas, zarzamoras, frutas cítricas, chocolate, nueces, bebidas derivadas de la uva como el vino tinto, el té verde y negro, así como en otros alimentos (Estrada *et al.*, 2012). Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo y fenólicos con excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez *et al.*, 2002).

Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano, compuesto por dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo de

pirano (C). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades oxido-reductoras de sus grupos hidroxilo y fenólicos así como de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en diferentes grupos.

Flavonas: Son mucho menos comunes que los flavonoles en frutas y verduras. Las flavonas consisten principalmente en glucósidos de luteolina y apigenina. Las únicas fuentes comestibles importantes de flavonas identificadas hasta la fecha son el perejil y el apio. Cereales como el mijo y el trigo contienen C-glucósidos de flavonas ([Martínez et al., 2002](#); [Manach et al., 2004](#)).

Flavonoles: Son los flavonoides más abundantes en los alimentos, los principales representantes son quercetina que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo •OH en posición 3 del anillo C y kaempferol ([Martínez et al., 2002](#)). Están generalmente presentes a concentraciones relativamente bajas de 15 a 30 mg/kg de peso fresco. Las fuentes más ricas son cebollas (hasta 1.2 g/kg de peso fresco), col rizada, poro, brócoli y arándanos. El vino tinto y el té también contienen hasta 45 mg de flavonoles/L. Estos compuestos están presentes en formas glicosiladas. El resto de azúcar asociado es muy a menudo glucosa o ramanosa, pero también pueden estar implicados otros azúcares (por ejemplo, galactosa, arabinosa, xilosa, ácido glucurónico). Estos flavonoles se acumulan en los tejidos externos y aéreos (piel y hojas) debido a que su biosíntesis es estimulada por la luz. Existen diferencias marcadas en la concentración entre trozos de fruta en el mismo árbol e incluso entre los diferentes lados de una sola pieza de fruta, dependiendo de la exposición a la luz solar. Del mismo modo, en las hortalizas de hojas como la lechuga y la col, la concentración de glicósidos es ≥ 10 veces más alta en las hojas exteriores verdes que en las hojas internas de color claro. Este fenómeno también explica el mayor contenido de flavonoles en tomates cherry que de tomates estándar, porque tienen diferentes proporciones de piel ([Manach et al., 2004](#)).

Flavanonas: Se encuentran en los tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta, pero están presentes en altas concentraciones sólo en los cítricos. Las principales agliconas son naringenina en pomelo, hesperetina en naranjas y eriodictiol en limones. Las flavanonas están generalmente glicosiladas por un disacárido en la posición 7, una neohesperidosa, que imparte un sabor amargo (tal como la naringina en el pomelo), o una rutinosa, que no tiene sabor. El jugo de naranja contiene entre 200 y 600 mg de hesperidina/L y de 15 a 85 mg de narirutina/L; en un solo vaso de jugo de naranja puede contener de 40 a 140 mg de glucósidos de flavanona. Debido a que las partes sólidas de los cítricos, particularmente el albedo (la parte esponjosa blanca) y las membranas que separan los segmentos, tienen un contenido muy alto de flavanona, la fruta entera puede contener hasta 5 veces más que un vaso de jugo de naranja ([Manach et al., 2004](#)).

Antocianidinas: Se presentan unidas al grupo •OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Los pigmentos que producen las antocianinas existen en diferentes formas químicas, tanto coloradas como incoloras, según el pH. Aunque son altamente inestables en la forma de aglicona (antocianidinas), mientras están en plantas, son resistentes a la luz, pH y condiciones de oxidación que pueden degradarlos. La degradación se evita mediante glicosilación, generalmente con una glucosa en la posición 3, y esterificación con diversos ácidos orgánicos (ácidos cítrico y málico) y ácidos fenólicos. Además, las antocianinas se estabilizan mediante la formación de complejos con otros flavonoides (copigmentación). En la dieta humana, las antocianinas se encuentran en el vino tinto, ciertas variedades de cereales y ciertos vegetales frondosos y de raíz (berenjenas, col, frijoles, cebollas, rábanos), pero son más abundantes en la fruta. La cianidina es la antocianidina más común en los alimentos ([Manach et al., 2004](#)).

Isoflavonas: Son flavonoides con similitudes estructurales con los estrógenos. Aunque no son esteroides, tienen grupos hidroxilo en las posiciones 7' y 4' en una configuración análoga a la de los hidroxilos en la molécula de estradiol. Esto les confiere propiedades pseudohormonales, incluyendo la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos, y los mismos se clasifican a menudo como estrogénicos. Las isoflavonas se encuentran

casi exclusivamente en plantas leguminosas. También están presentes en el vino tinto, pero el té verde y el chocolate son, con mucho, las fuentes más ricas. La catequina y la epicatequina son los principales flavanoles de los frutos, mientras que la galocatequina, la epigalocatequina y el galato de epigalocatequina se encuentran en ciertas semillas de plantas leguminosas. En contraste con otras clases de flavonoides, los flavanoles no son glicosilados (Manach *et al.*, 2004).

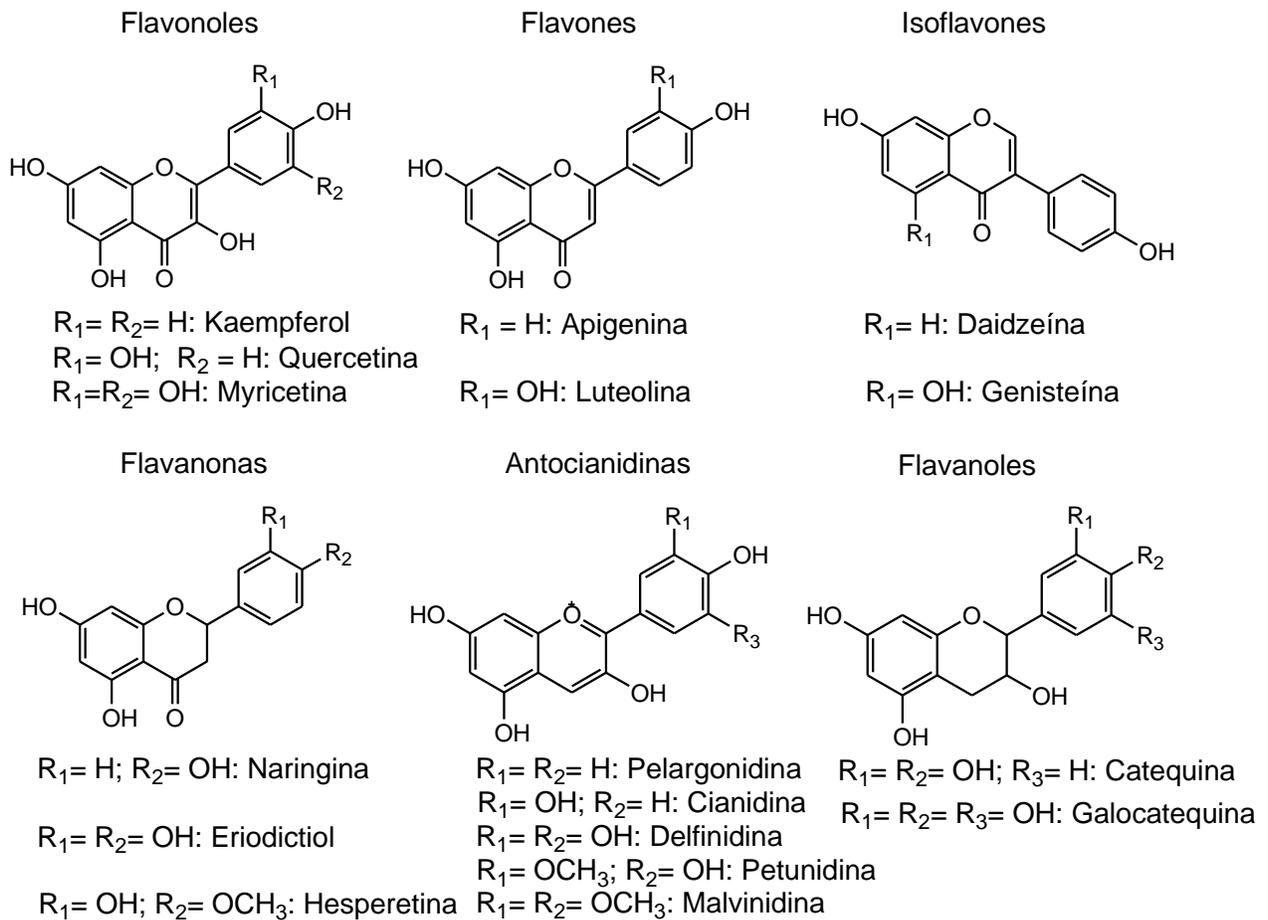


Figura 4. Estructuras químicas de flavonoides.

II.3 Antioxidante

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación del sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los mecanismos de defensa antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidante son muy diversos y específicos; para hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas; con un gran número de sitios de acción en el organismo y en las células, pudiendo clasificarse de la siguiente manera:

a) Antioxidantes endógenos

Macromoléculas que inhiben especies reactivas y evitan su acción. Por ejemplo, proteínas que acumulan o transportan metales de transición, como la transferrina y la ceruloplasmina o como el oxígeno, la hemoglobina y la mioglobina.

Enzimas con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva, por ejemplo: la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del O_2 a H_2O_2 ; la glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima dependiente de selenio y cataliza la reducción del H_2O_2 o L-OOH; la glutatión sulfhidril transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico del cosustrato glutatión sobre el centro electrófilo de un gran número de oxidantes y la catalasa (CAT) que reduce el H_2O_2 a H_2O (Blokhina *et al.*, 2003; Quintanar y Calderón, 2009). Sustratos antioxidantes, son empleados por las enzimas para poder reducir parcialmente a los radicales libres y las especies reactivas. Por ejemplo; el glutatión y el NADPH⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, abreviada NADP⁺ en su forma oxidada y NADPH⁺ en su forma reducida). El glutatión es un tripéptido (γ -glutamilcisteinil-glicina) con gran facilidad para ceder electrones (nucleofílico) debido a su grupo sulfhidrilo (-SH) y su potencial redox; una vez que queda oxidado se puede regenerar gracias a la enzima glutatión reductasa (GR) que lo reduce con la oxidación de NADPH⁺. El NADPH⁺ tiene un potencial redox negativo y por ende es un importante donador de electrones e hidrógenos, con lo que puede pasar a NADP⁺, siendo empleado por diversas enzimas como cosustrato.

b) Antioxidantes exógenos

Son aquellos que provienen de la dieta, tales como la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno (provitamina A), cobre, selenio, zinc, manganeso, polifenoles, licopenos, ácidos egálicos, flavonoides (quercetina, catequinas, hespiridina) y taninos entre otros (Dragsted, 2008; Rendón *et al.*, 2007; Quintanar y Calderón, 2009).

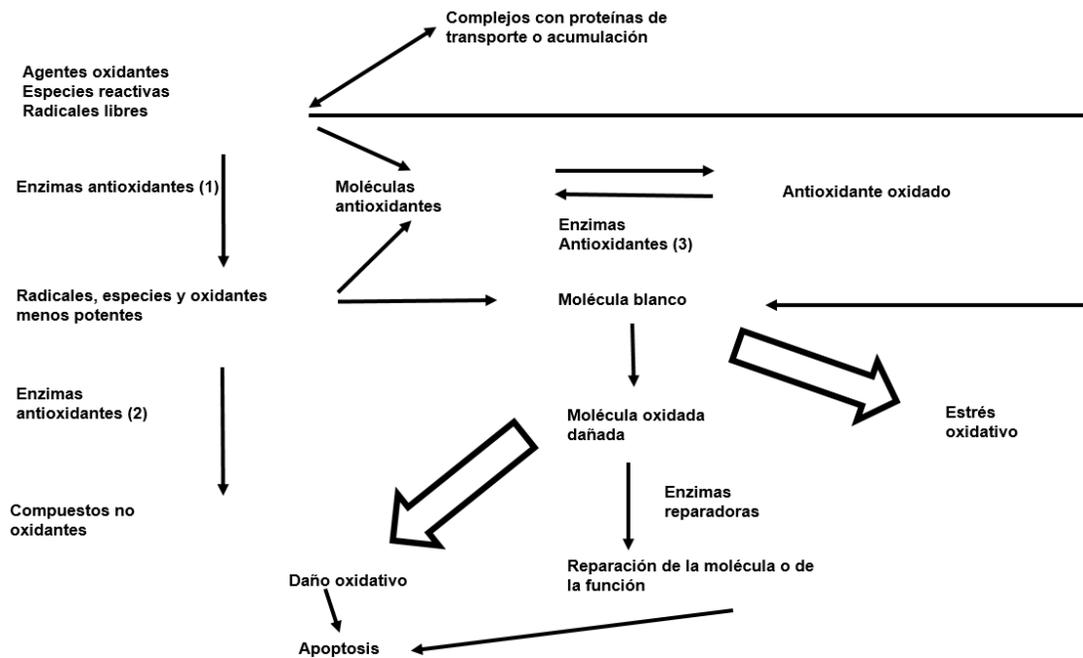


Figura 5. Sistemas antioxidantes en el estrés oxidativo. El esquema muestra los complejos de transporte o acumulación de oxidantes, la interacción con moléculas antioxidantes y los 3 tipos de enzimas antioxidantes. Las tipo 1 reducen parcialmente a los agentes oxidantes, generando oxidantes menos potentes (por ejemplo: SOD). La tipo 2 reducen a los oxidantes a compuestos no oxidantes (por ejemplo: CAT). Las tipo 3 son las enzimas encargadas de reducir nuevamente (regenerar) a los antioxidantes que fueron oxidados para reducir a los oxidantes (por ejemplo: GR). A pesar de las defensas las macromoléculas pueden verse afectadas por la oxidación, esto produce daño oxidativo y requiere de ser reparado por las enzimas correspondientes (por ejemplo: polimerasas). Si la reparación falla o el daño es muy extenso se puede generar apoptosis (Quintanar y Calderón, 2009).

II.4 *Acacia farnesiana* (L.) Willd

Acacia farnesiana es una planta perteneciente a la familia Leguminosae. La planta es principalmente de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Es el segundo género más grande de la familia de las leguminosas, cuenta con aproximadamente 1,350 especies ampliamente distribuidas en el mundo, la mayor abundancia de este género se encuentra en Australia con 957 especies, seguida de América con 185, África con 144, Asia con 89 (Maslin et al., 2003) y 10 en Europa (Papaefthimiou et al., 2017). *Acacia farnesiana* mantiene sus frutos durante la estación seca y son utilizados como alimento de rumiantes en épocas de escasez (García et al., 2009).



Figura 6. *Acacia farnesiana*. Fotografía tomada por el autor.

Acacia farnesiana es un árbol mediano tipo arbusto, de copa uniforme y compacta, las hojas se desarrollan a lo largo del ramaje. Su fuste es espinoso, es ramificado desde la base, la corteza está compuesta por delgadas espinas blancas grisáceas, de 5 a 6 mm de espesor, presenta un follaje semicaducifolio, sus hojas son compuestas y bipinadas, alternas. Sus flores son diminutas, de color amarillo (Rojas y Torres, 2012). La distribución en México es muy amplia, su área de distribución es desde el sur de Sonora hasta Chiapas, he incluye los estados de Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila. Colima. Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo. Sinaloa, Sonora, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán, Veracruz y Zacatecas (CONABIO, 2017).

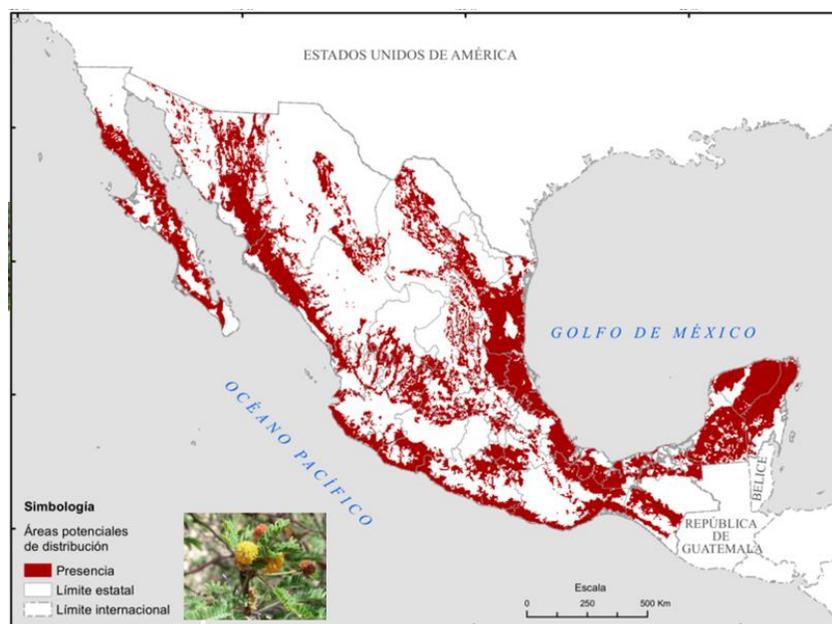


Figura 7. Mapa de distribución potencial de la especie *Acacia farnesiana*, (L.) Willd. (CONABIO, 2005).

II.4.1 *Acacia farnesiana* como recurso forrajero no convencional

Las condiciones climáticas en regiones áridas y semiáridas limitan el crecimiento de las especies forrajeras tradicionales y los pastizales en estas áreas se caracterizan por una serie de leguminosas de árboles y arbustos que han sido estudiadas en diferentes partes del mundo como recursos potenciales de alimentación, en particular los que se encuentran durante la época de sequía. Los frutos de estas especies pueden ser una fuente de proteína en la estación seca. El Huizache (*Acacia farnesiana*) es un árbol de leguminosas común en las zonas áridas y semiáridas de México que mantiene sus frutos durante la estación seca que se puede utilizar como alimento de las ovejas y cabras en épocas de escasez en zonas secas del centro de México y en algunos estados los agricultores recolectan vainas de huizache durante el tiempo de máxima producción en otoño, así alimentan a las ovejas durante los meses secos de invierno (García *et al.*, 2009). Además los análisis efectuados hasta ahora indican que la aplicación de las tecnologías con árboles forrajeros en las fincas es económicamente rentable y que su presencia contribuye a mejorar la situación de la economía familiar (Benavides, 1999).

En este sentido algunos autores han demostrado beneficios de la utilización de los frutos de *acacia farnesiana* (FAF) como recurso forrajero. [Velázquez y colaboradores en 2011](#) demostraron que la inclusión de 200 a 400 g/kg (base seca) FAF en las dietas para ovinos puede ser recomendable, ya que mejora el consumo y no influye negativamente en la respuesta productiva de los animales ni en la producción de lana, así también un estudio reportó que la dieta de los animales alimentados con los FAF no fue representativa para afectar negativamente la salud y la respuesta de los animales. Los resultados colocaron a los FAF como una opción para el suministro de piensos y nutrientes a la dieta de las ovejas y el reemplazo de ingredientes de alto valor para la alimentación humana como maíz en el trópico mexicano ([Rojas et al., 2015](#)).

Cuadro 3. Análisis químico nutricional (g/100 g base seca (BS)) de los frutos de *Acacia farnesiana*

Parametros	<i>Acacia farnesiana</i>	
	Toyas et al., 2013 Barrientos et al., 2012	Velázquez et al., 2011
Materia seca	94.22	89.6
Materia orgánica	87.88	96.2
Humedad	5.78	10.4
Proteína cruda	14.69	11.5
Extracto etéreo	2.5	18
Extracto Libre de Nitrógeno	69.19	-
Cenizas	6.34	6.6
Fibra cruda	1.5	-

II.4.2 *Acacia farnesiana*, (L.) Willd como fuente de compuestos bioactivos

En la literatura se han descrito diferentes grupos de metabolitos secundarios obtenidos del género *Acacia* tales como aminas, proteínas, alcaloides, aceites esenciales, aminoácidos no proteínicos, cumarinas, diterpenos, ácidos grasos, triterpenos, fitoesteroles, saponinas, flavonoides, gomas, taninos hidrolizables y condensados ([Seigler, 2003](#); [Leal, 2016](#); [Arasaretnam y Ebenezer, 2017](#)). Específicamente en los FAF, las semillas y la planta se a descrito la presencia de quercetina, ácido gálico,

glucósidos de flavonoides (7-O-β-glucopiranosido de (2S) naringenina y 7-O-β-(4",6"-digaloiil glucopiranosido) de naringenina), metil galato, catequina epicatequina, (3β, 22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ol, tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxiopilo, β-D-glucopiranosido de (3β, 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo, pinitol, sacarosa, ácido digálico, galato de etilo, ácido elágico, naringina, kaempferol, naringenina, ácido málico, ácido cumárico, digalato de metilo, eriodictiol, acacetina, criseriol, ácido cítrico, (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-2,3-dihidrochromen-4-ona (taxifolina). (Seigler, 2003; Manríquez *et al.*, 2007; Cuchillo *et al.*, 2010; Hannachi *et al.*, 2011; Maldini *et al.*, 2011; RamLi *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2013b, Delgadillo *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2016; Hernández, 2017). Se han reportado diversos usos de las diferentes partes de *Acacia farnesiana*, la corteza de la planta se utiliza como astringente y demulcente, sus raíces gomosas se mastican para aliviar el dolor de garganta y para aliviar la diarrea, las flores se utiliza para ayudar a aliviar el dolor de estómago, la hoja en polvo se rocía sobre las heridas, ya que se reporta que actúa como un agente curativo, las vainas y semillas se utilizan para tratar dolor de garganta, así como conjuntivitis (Leal *et al.*, 2016).

Los compuestos antes mencionados, por su naturaleza química pueden participar en la modulación de diversos procesos fisiológicos (Muthaura *et al.*, 2007), por mencionar algunos, se usa como fitorremediadora por su efecto de fitoextracción del plomo que se encuentra en el suelo (Márquez *et al.*, 2011), en la elaboración de resinas por su alto contenido de taninos y la capacidad que estos tienen de adsorber cationes Na⁺ y Ca²⁺ (Arasaretnam y Ebenezer, 2017), también como fuentes de nutrientes de bajo costo para pequeños rumiantes (García *et al.*, 2009; Cuchillo *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2015; Velásquez *et al.*, 2011), como antiinflamatorios, analgésico y antitumorales (Jayatilake *et al.*, 2003; Abbouyi *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2016).

II.5 Localización de compuestos bioactivos en leguminosas

Los flavonoides desempeñan un papel importante en las respuestas a varios factores ambientales, incluyendo tanto bióticos, por ejemplo, ataque de patógenos, herbívoros, y estrés, como abióticos, por ejemplo, luz ultravioleta (UV), estrés salino y deficiencias de nutrientes.

Los flavonoides pueden ser transportados dentro y entre las células e incluso entre capas de tejido, conduciendo a menudo a la liberación activa o pasiva en la superficie de la planta para llevar a cabo su papel en la regulación de las interacciones de la planta con su entorno. En tejidos específicos, la síntesis y acumulación de flavonoides se encuentra a menudo en células distintas. En las raíces, los flavonoides se acumulan en tipos de células específicas, es decir, en la punta de la raíz y en las células de la tapa de la raíz, desde donde pueden desprenderse en el suelo.

A nivel celular, los flavonoides se encuentran en el espacio extracelular y en la mayoría de los compartimentos de las células vegetales, es decir, citosol, vacuola, retículo endoplásmico, cloroplasto, núcleo y en las pequeñas vesículas. Sin embargo, la mayoría de los flavonoides conjugados se secuestran en la vacuola, donde por ejemplo el ambiente ácido vacuolar y los copigmentos determinan la pigmentación de la flor mediada por antocianina. Además, las subunidades de proantocianidinas se polimerizan y posteriormente se convierten en productos de oxidación en las vacuolas.

Se han propuesto dos mecanismos para el movimiento de flavonoides intracelulares: transporte mediado por el tráfico de vesículas y transporte mediado por transportador de membrana ([Gholami et al., 2014](#)).

II.5.1 Efecto de los compuestos bioactivos en leguminosas para la adquisición de nutrimentos

Los flavonoides pueden intervenir en la leguminosa en la obtención de nutrimentos, esto debido a cambios químicos del suelo, ya sea a través de contribuciones directas o indirectas a la disponibilidad de nitrógeno (N), fósforo (P) y hierro (Fe). Asimismo, estos elementos puede afectar la biosíntesis de flavonoides.

Se ha demostrado que la producción de flavonoides en las leguminosas está regulada por la presencia de P y la acumulación de flavonoides se ve afectada por la limitación de N. Dado que los flavonoides pueden actuar como quelantes metálicos, se ha propuesto una función en la movilización química de formas de P, de suelo poco solubles. Un ejemplo reportado donde un isoflavonoides en la raíz de una leguminosa que fue capaz de reaccionar con fosfato férrico del suelo para formar fosfato y hierro. Los flavonoides, incluyendo la isoflavona (genisteína) y los flavonoles (quercetina y kaempferol), pueden alterar la disponibilidad de Fe reduciendo Fe^{3+} a Fe^{2+} y quelando el hierro de otro modo no disponible en óxidos de hierro y/o minerales de hierro (poco solubles) ([Gholami et al., 2014](#)).

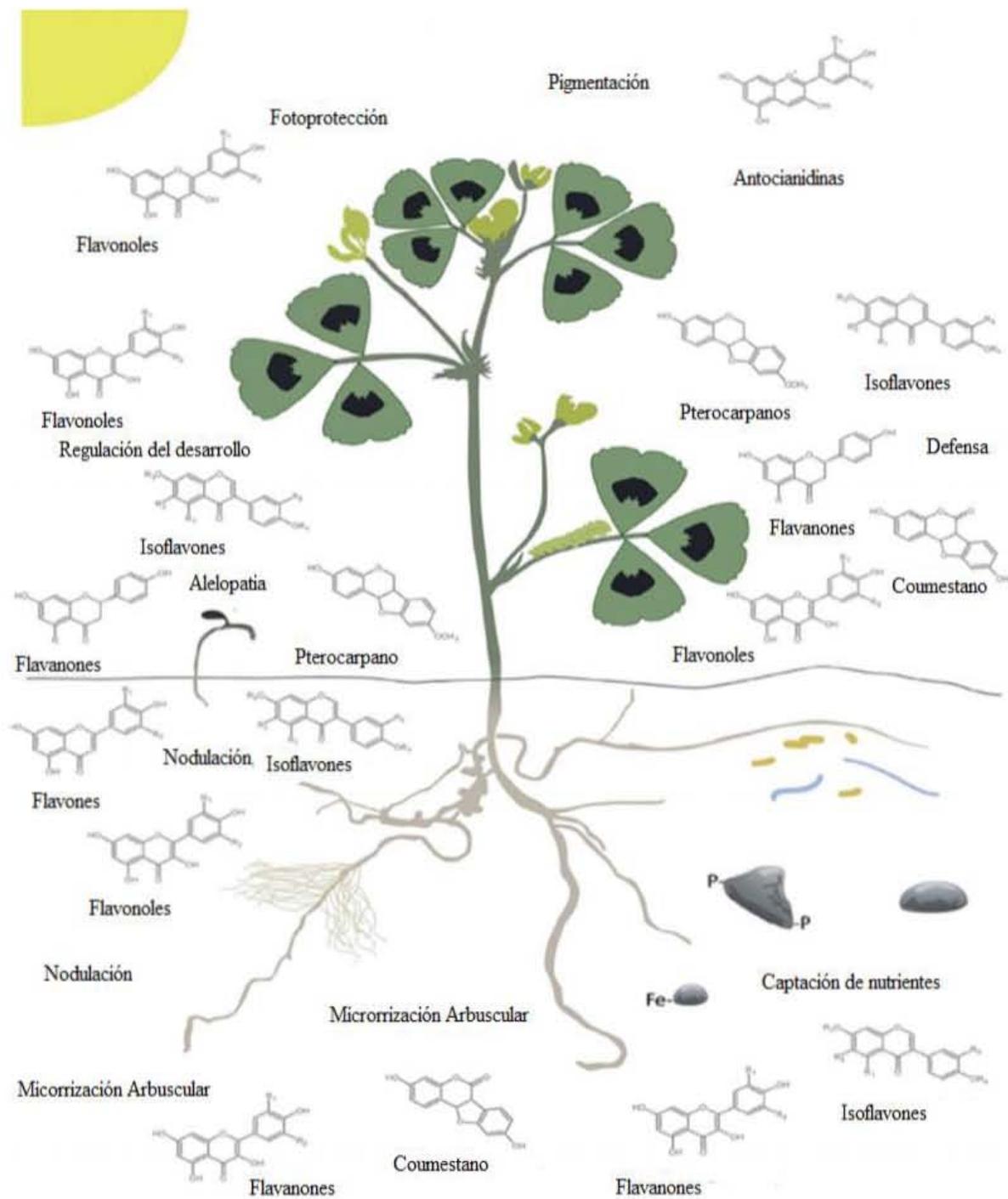


Figura 8. Las diferentes funciones biológicas *in situ* de las clases específicas de flavonoides y sus compuestos representativos (Gholami *et al.*, 2014).

II.5.2 Biosíntesis de compuestos bioactivos en las leguminosas

Las leguminosas (*Fabaceae*) constituyen una familia vegetal muy diversa que abarca cultivos de importancia económica, como ya se mencionó el género *Acacia* es el segundo más grande de la familia de las leguminosas (Maslin *et al.*, 2003).

Las leguminosas tienen la capacidad de establecer interacciones simbióticas con las bacterias fijadoras de nitrógeno. Además, las leguminosas son una fuente de fitoquímicos que promueven la salud, entre las clases de metabolitos secundarios producidos por las leguminosas se encuentran: saponinas triterpénicas, isoflavonoides y las ligninas que son otros compuestos fenólicos que se encuentran en todas las plantas superiores y son un factor importante que afecta la digestibilidad de las paredes celulares. Las saponinas son una clase estructuralmente diversa de glucósidos anfipáticos con un esteroide lipófilico, un alcaloide esteroideo o un esqueleto de aglicona triterpenoidea (también llamada sapogenina) que está covalentemente unida a una (monodesmosídica) o más cadenas de azúcar hidrofílico di- o tridesmosídico vía un enlace glicosídico.

Los flavonoides juegan importantes papeles bioquímicos y fisiológicos en las plantas y están involucrados en las interacciones de éstas con su ambiente, tanto para simbiosis beneficiosas como para respuestas de estrés biótico y abiótico. Todas las subclases principales de flavonoides, es decir, antocianidinas, auronas, chalconas, flavanoles (proantocianidinas), flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonas están presentes en el género *Acacia*, dando lugar a una red sintética compleja y ramificada (Gholami *et al.*, 2014).

II.5.2.1 Biosíntesis de los flavonoides

La vía biosintética que conduce a la producción de flavonoides se deriva de la vía fenilpropanoide. Se inicia con fenilalanina catalizada por las actividades secuenciales de la fenilalanina amonioclasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumarato:CoA ligasa (4CL) generando el ácido p-cumárico y p-coumaroil-CoA, por un lado y por otro la formación citosólica de malonil-CoA a partir de acetil-CoA por acetil-CoA carboxilasa

(ACC). Entonces, una molécula de p-coumaroil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA sirven como sustratos para la chalcona sintasa (CHS), la cual ejecuta una serie de reacciones de descarboxilación y condensación secuenciales, dando lugar a la formación de un intermedio de policétido. Este intermedio experimenta reacciones de ciclación y aromatización para formar el anillo A y la chalcona resultante (naringenina chalcona).

La chalcona reductasa (CHR), cuyo gen correspondiente se encuentra sólo en plantas leguminosas, elimina el grupo hidroxilo del segundo malonil-CoA durante la biosíntesis de chalconas, que junto con el CHS conduce a la biosíntesis de la isoliquiritigenina, el precursor de la 5-desoxiflavonoides.

Los dos flavanones, naringenina y liquiritigenina, los precursores de 5-hidroxi y 5-desoxi-flavonoides, respectivamente, se producen a través de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa (CHI). Se han descrito dos clases de CHI. Los CHI de tipo I se encuentran tanto en leguminosas como en no leguminosas, y se convierte naringenin chalcona en naringenina. Los CHI de tipo II son enzimas específicas de las leguminosas que pueden isomerizar tanto la naringenina chalcona como la isoliquiritigenina a la naringenina y la liquiritigenina, respectivamente (Gholami *et al.*, 2014; Jonker y Yu, 2017).

II.5.2.2 Biosíntesis de isoflavonoides

Los isoflavonoides tienen el anillo B unido al anillo C a través de la C-3 en lugar de la posición C-2. El primer paso comprometido de la biosíntesis de isoflavonoides comienza con una migración del arilo oxidativo de C-2 a C-3, catalizada por la enzima 2-hidroxiisoflavanona sintasa del citocromo P450 (también conocida como isoflavona sintasa, IFS). Posteriormente, la deshidratación de los intermedios 2-hidroxiisoflavanona, es decir, 2,5,7,4'-tetrahidroxiisoflavanona y 2,7,4'-trihidroxiisoflavanona, por 2-hidroxiisoflavanona deshidratasa (2HID), forman las isoflavonas genisteína y daidzeína, respectivamente (Gholami *et al.*, 2014).

II.5.2.3 Biosíntesis de flavonol

Se derivan de los dihidroflavonoles, que son el producto de la enzima flavona 3-hidroxilasa (F3H), la flavonol sintasa (FLS) cataliza el paso clave en la biosíntesis de flavonol, convirtiendo los dihidroflavonoles, como dihidrokaempferol, dihidroquercetina y dihidromiricetina, en los correspondientes favonoles, kaempferol, quercetina y miricetina, respectivamente ([Gholami et al., 2014](#)).

II.5.2.4 Biosíntesis de flavonas

La biosíntesis de flavonas a partir de flavanonas se produce introduciendo un doble enlace entre C-2 y C-3 que es catalizado por flavono sintasa (FNS). En las plantas se han caracterizado dos FNS diferentes (FNS I y FNS II). FNS I se encuentra principalmente en los miembros de la familia *Apiaceae*, mientras que FNS II se encuentra extendida entre todas las plantas superiores. En las raíces y las semillas se encuentran las flavonas 7,4'-dihydroxiflavona y las principales son la apigenina y luteolina ([Gholami et al., 2014](#)).

II.5.2.5 Biosíntesis de antocianinas

El primer paso dedicado hacia la biosíntesis de antocianinas está controlado por dihidro flavonol-4-reductasa (DFR) que utiliza dihidroflavonoles (dihidrokaempferol, dihidroquercetina y dihidromiricetina), son sustratos comunes de DFR y se convierten en leucopelargonidina, leucocianidina y leucodelfinidina, respectivamente.

El siguiente paso en la biosíntesis de antocianinas es catalizado por la antocianidina sintasa (ANS) que convierte las leucoantocianidinas: leucocianidina, leucopelargonina y leucodelfinidina en las correspondientes antocianidinas: cianidina, pelargonina y delfinidina, respectivamente ([Gholami et al., 2014](#)).

II.5.2.6 Biosíntesis de proantocianinas

Las proantocianidinas (PA), o taninos condensados, comprenden mezclas de oligómeros o polímeros de unidades flavan-3-ol, las cuales el primer paso para su biosíntesis está controlado por DFR que utiliza dihidroflavonoles (dihidrokaempferol, dihidroquercetina y dihidromiricetina), son sustratos comunes de DFR y se convierten en leucopelargonidina, leucocianidina y leucodelphinidina, respectivamente.

La hidroxilación en el anillo A conduce a la estereoquímica en C-4, que tiene gran importancia en la biosíntesis de PA's, ya que todos los intermedios quirales de la biosíntesis de PA hasta (+)-catequina poseen estereoquímica 2,3-*trans*. Por el contrario, la (-)-epicatequina con estereoquímica 2,3-*cis* proviene de precursores de antocianidina que proporcionan otra unidad de arranque para la biosíntesis de PA. Aunque la única diferencia entre las dos unidades de arranque de la 2,3-*cis*-2R, 3R-(-)-epicatequina y 2,3-*trans*-2R, 3S-(+)-catequina es la configuración estereoquímica *cis* o *trans*, se sintetizan por dos vías biosintéticas distintas.

La leucoantocianidina reductasa (LAR) y la antocianidina reductasa (ANR), ambos implicados en la biosíntesis de la PA's. LAR utiliza los mismos sustratos que el ANS, es decir flavan-3,4-diols, para convertirlos a sus correspondientes PA "unidades de arranque", el 2,3-*trans*-flavan-3-ols catequina, afzelequina y galocatequina, respectivamente.

La ANR utiliza como sustratos las antocianinas formadas por ANS en epicartina-2-flavan-3-ol como (-) epicatequina, (-) epiafzelequina y (-) epigalocatequina ([Gholami et al., 2014](#)).

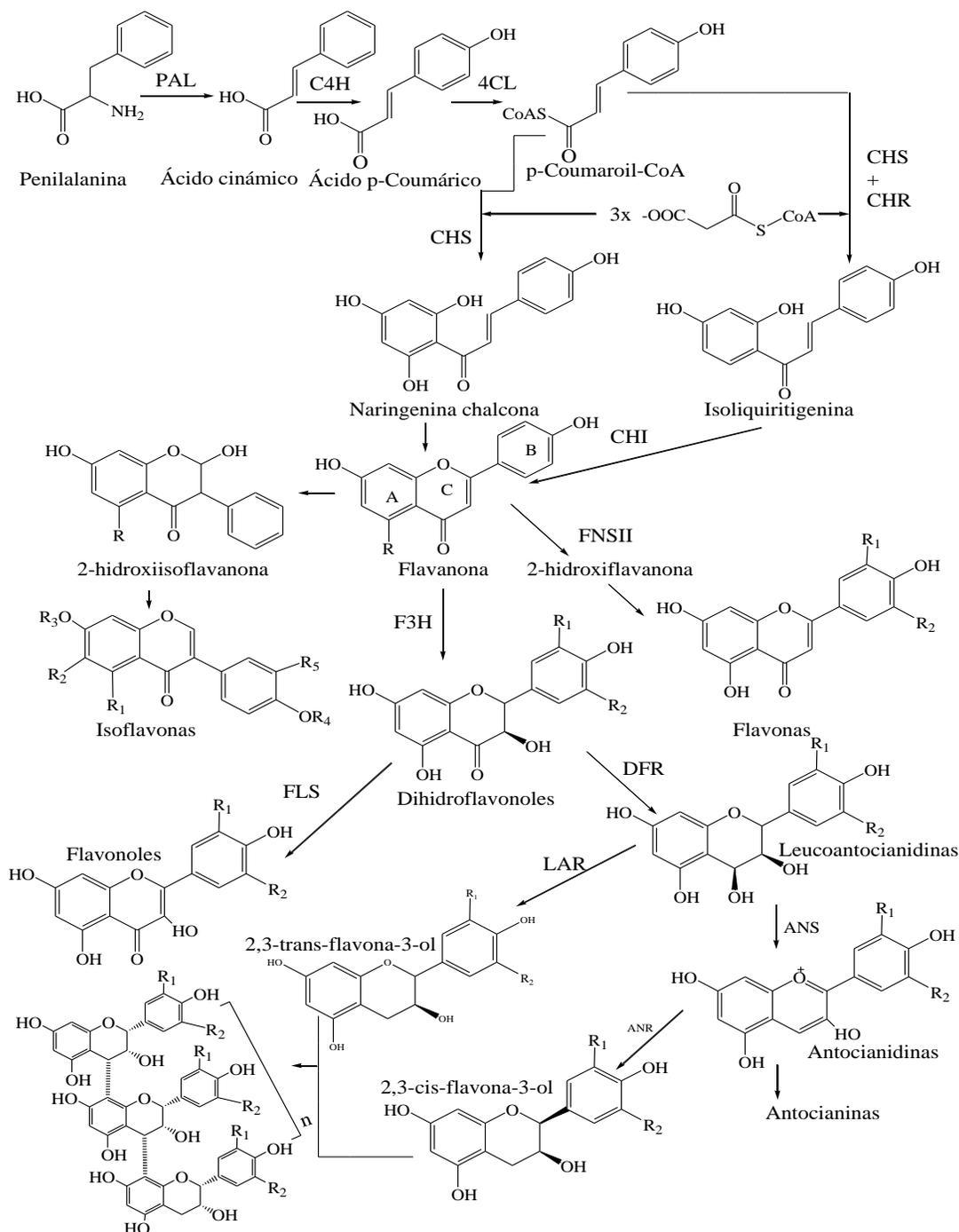


Figura 9. Proceso general de biosíntesis de fenoles. PAL: fenilalanina amoniaco-liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato:CoA ligasa; CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; CHR: chalcone reductasa IFS: isoflavona sintasa; 2HID: 2-hidroxiisoflavanona deshidratasa; FNS: flavona sintasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; FLS: flavonol sintasa; DFR: dihidro flavonol-4-reductasa; LAR: leucoantocianidina reductasa; ANR: antocianidina reductasa; ANS: antocianidina sintasa (Gholami *et al.*, 2014).

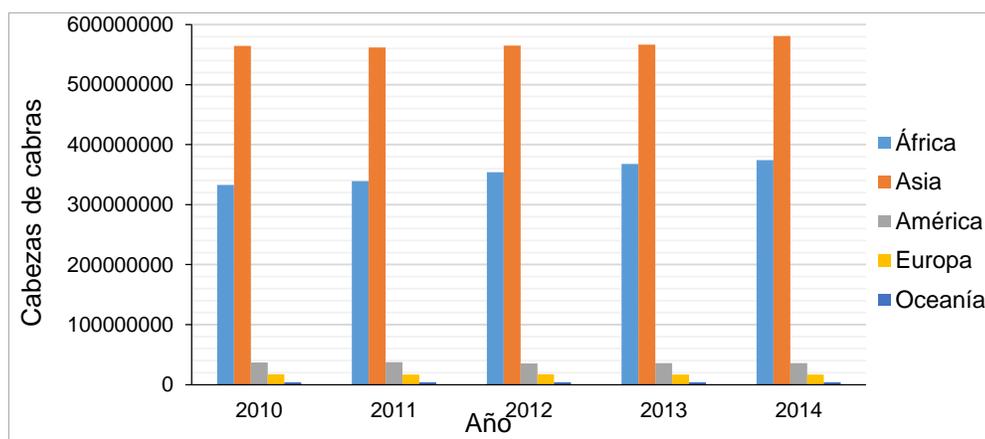
II.6 Leche caprina

II.6.1 Características generales de la producción caprina en el mundo

Alrededor del 95 % de la población caprina mundial se encuentra en Asia, África y América Latina. Asia representa la mayor parte, con aproximadamente el 60 % del total. Las cabras lecheras se crían en su mayor parte en la región mediterránea, Asia meridional y partes de América Latina y África. Las cabras requieren bajos costos de inversión de capital, producción y tienen una rápida rotación generacional de animales, así como pronta producción de leche y el periodo de gestación es corto.

Las cabras tienen un mayor rendimiento lechero que las ovejas. Son la principal fuente de leche y carne para muchos agricultores de subsistencia de las regiones tropicales. Las cabras están distribuidas en las zonas áridas y semiáridas; generalmente se mantienen en pequeños rebaños compuestos de dos a diez animales (FAOSTAT, 2017). El 88 % de la población mundial de cabras está localizada en Asia y África, en su mayoría (80 %) en los trópicos y sub-trópicos. Los principales productores de caprinos en el mundo son China, con una cuarta parte de la población mundial, seguida por la India con un octavo de la población, le siguen de lejos Paquistán, Sudán, Kazajistán, Bangladesh, Nigeria e Irán, países donde las cabras se producen principalmente en la población de bajos recursos, los cuales destinan casi todos sus sub-productos (pieles y pelo) a la transformación artesanal, mientras que la leche y carne se destinan para el consumo familiar (SAGARPA, 2013).

Grafica 1. Población mundial de cabezas de cabras (FAOSTAT, 2017)



II.6.2 Características generales de la producción caprina en México

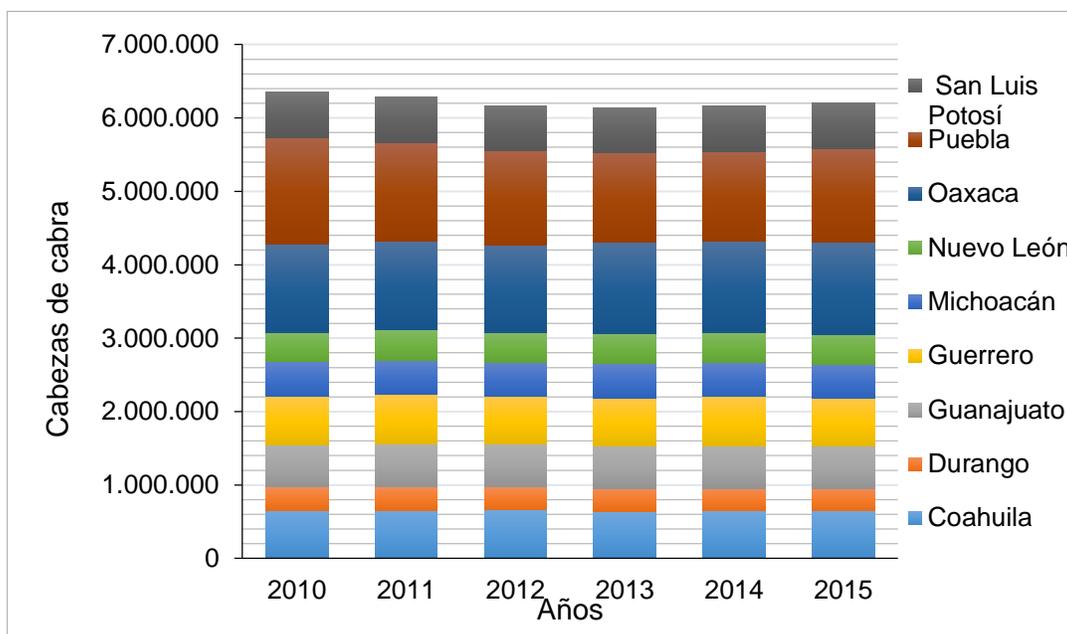
Los caprinos fueron de las primeras especies en ser domesticadas, en parte por su capacidad de adaptación y gran resistencia a ambientes adversos, por su capacidad de ramoneo y por aprovechar la celulosa, que le permite consumir forrajes de muy baja calidad; así como por ser una fuente tradicional de carne, leche, fibras y cuero. Ya sea en sistemas intensivos o en condiciones de marginación, la producción caprina forma parte de diversas culturas, México no es la excepción, ya que cuenta con el 1 % de la población mundial de cabras ([SAGARPA, 2013](#)).

En México, el productor tiende a complementar sus actividades en el medio rural. Una de las labores más importantes que complementan la actividad agrícola del campesino y que le aseguran alimento de alta calidad, es la explotación de las cabras la mayoría en sistemas de producción extensivos y semi-extensivos, pastoreando en zonas áridas o semiáridas. El costo accesible de estos animales y la adaptabilidad de esta especie a las zonas desérticas de México, ha propiciado la explotación de este ganado en toda la gama de ecosistemas característicos de las zonas áridas del país. La región norte de México está comprendida dentro de los desiertos Chihuahuense y Sonorense, esta zona, a nivel nacional, es una de las áreas con la densidad más alta de caprinos ([CONACyT, 2017](#)).

En México, la producción caprina se desarrolla en unas 350,000 unidades de producción, con una población cercana a 9 millones de cabezas, que se distribuyen fundamentalmente en cuatro zonas: Árida y Semiárida 39.7 %, Centro Bajío 21.4 %, Región Mixteca 26.4 % y Zona Tropical 12.4 % ([SAGARPA, 2013](#)). A pesar de la importancia que las zonas áridas y semiáridas de México representa para la industria caprina, se tiene un desconocimiento sobre la forma de utilizar racionalmente los recursos forrajeros de los tipos de vegetación comprendidos en esta zona. Salvo escasos y fragmentarios datos sobre la dieta de las cabras en matorrales micrófilos de esta región, no se dispone de información sobre el impacto del pastoreo de las cabras sobre la dinámica de la vegetación y suelo del desierto.

La alimentación de este ganado en la región del norte de México se basa en el uso de la vegetación de agostadero típica del desierto mencionado, aunado a los esquilmos que se generan del distrito de riego enclavado en la región, con esquemas de producción cabrito-leche articulados a canales de comercialización e industrialización. Dicho esquema productivo se basa en el uso de animales encastados con una alta proporción de razas lecheras (Alpina, Saanen, Toggenburg y Nubia) con un énfasis productivo lechero, pero que en paralelo, presentan un complejo esquema de reproducción estacional, lo cual limita la posibilidad de ofertar productos caprinos a lo largo del año, generando déficits en ciertas épocas y sobreoferta en otras, con la consecuente variabilidad en el ingreso económico hacia el caprinocultor (CONACyT, 2017).

Grafica 2. Población nacional de cabezas de cabras (SIAP, 2017)



II.6.3 Metabolización de compuestos bioactivos en rumiantes

Las proantocianidinas se almacenan en la vacuola de las plantas para evitar la interacción con cualquier enzima involucrada en los procesos metabólicos de la planta.

Cuando las proantocianidinas están presentes en la célula vegetal, la digestión por microorganismos será mucho más lenta, debido a que la invasión de los tejidos vegetales (células) por estos microorganismos es menor. Por lo tanto, los tejidos vegetales que contienen proantocianidinas se rompen más lentamente y menos extensamente que los tejidos vegetales que no las contienen. Esto reduce la accesibilidad de los contenidos de las células y los componentes de fibra para la utilización microbiana. Cuando la vacuola se rompe a través de la masticación y/o la digestión microbiana, las proantocianidinas pueden enlazarse con las proteínas circundantes (no solo con las proteínas dentro del tejido vegetal), sino también con las de la dieta, la saliva y proteína microbiana. El complejo proantocianidina-proteína es muy resistente a la digestión y a la utilización por microorganismos ruminales ([Patra y Saxena, 2010](#); [Jonker y Yu, 2017](#)).

Las proantocianidinas dependiendo del tipo de forraje difieren en su actividad biológica en la degradación ruminal ([Patra y Saxena, 2010](#); [Jonker y Yu, 2017](#)). Por ejemplo en la proteína Rubisco (estructura celular vegetal), la cual tiene una estructura cuaternaria que es relativamente inestable, por ello probablemente la proteína del Rubisco es más fácilmente precipitada por las proantocianidinas; las cuales también pueden unirse más fácilmente a una mezcla de proteínas, que con las proteínas individuales, esto debido a que ofrecen una mayor cantidad de sitios de unión ([Jonker y Yu, 2017](#)).

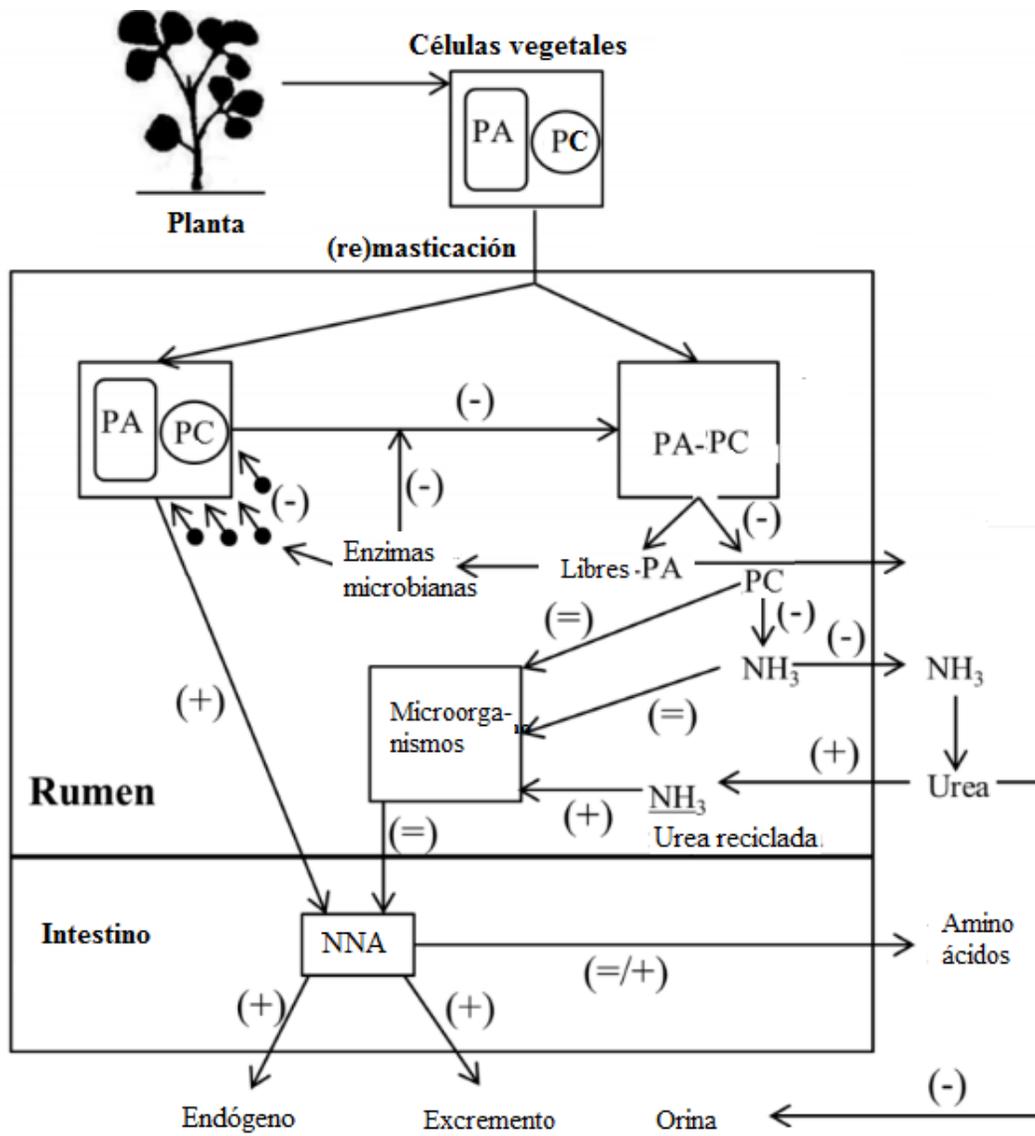


Figura 10. Diagrama de flujo esquemático de la digestión de proteína cruda (CP) a partir de forraje que contiene proantocianidinas (PA). Los símbolos entre paréntesis representan el efecto del forraje que contiene PA en comparación con el forraje libre de PA en el flujo proteico: (+) representa un flujo aumentado, (-) representa un flujo disminuido y (=) representa un flujo similar. NNA: Nitrógeno no amoniacal (Jonker y Yu, 2017).

II.6.4 Efecto de los compuestos bioactivos sobre los microorganismos del rumen

Se sabe que los flavonoides tienen efectos antimicrobianos, que también pueden interactuar positivamente o negativamente con los microorganismos ruminales.

La proteína excesiva liberada en el rumen por encima del requisito microbiano se convierte principalmente en amoníaco (NH_3) y energía para los microorganismos, que es absorbida a través de la pared del rumen y excretada en gran medida en la orina como urea.

La reducción de la tasa de degradación y la acumulación de la proteína en el rumen puede disminuir la formación de NH_3 y la excreción urinaria de nitrógeno. Una disminución lineal de NH_3 en el rumen ha sido reportada con el incremento en la concentración de las proantocianidinas, lo que puede contribuir a la reducción de la disponibilidad de las proteínas dietaría; también se ha documentado una reducción de la actividad proteolítica debido al efecto directo de proantocianidinas en las bacterias proteolíticas y protozoos en el rumen.

Las proantocianidinas que no se unen a la proteína se denominan proantocianidinas libres (PAL), las proantocianidinas que se unen a la proteína se consideran benéficas para el animal porque aumentan el flujo de proteínas al tracto digestivo inferior, mientras que las PAL son consideradas negativas porque afectan negativamente a la digestión de las fibras, especialmente la digestión de la hemicelulosa, otros efectos de estos compuestos se identifican en la interacción directa con minerales, microbios y enzimas microbianas; reduciendo la actividad proteolítica general (degradación de proteínas) en el rumen.

Como se mencionó las proantocianidinas inhiben la actividad enzimática fibrolítica, ureolítica y proteolítica por lo tanto inhiben el crecimiento de diversas especies de hongos, protozoos y bacterias; aunque se ha identificado que algunas especies bacterianas no son afectadas. Otro efecto de las proantocianidinas, sobre el crecimiento microbiano se debe a la reducida disponibilidad de nutrientes esenciales (por ejemplo, aminoácidos y minerales, hidratos de carbono y proteínas) y la formación de complejos

con lipoproteínas de membrana microbiana e interacciones directas con el metabolismo de los cuerpos microbianos.

La disminución de las concentraciones de NH₃ ruminal en el ganado alimentado con forrajes altos en proantocianidinas disminuye la producción de nitrógeno urinario, incrementándose la producción de nitrógeno fecal; siendo éste menos propenso a la volatilización como amoníaco, óxido nitroso; lo que disminuye la lixiviación como nitrato en el agua subterránea comparado con el nitrógeno urinario, lo que reduce el impacto ambiental de las excreción de nitrógeno por los rumiantes (Patra y Saxena, 2010; Jonker y Yu, 2017).

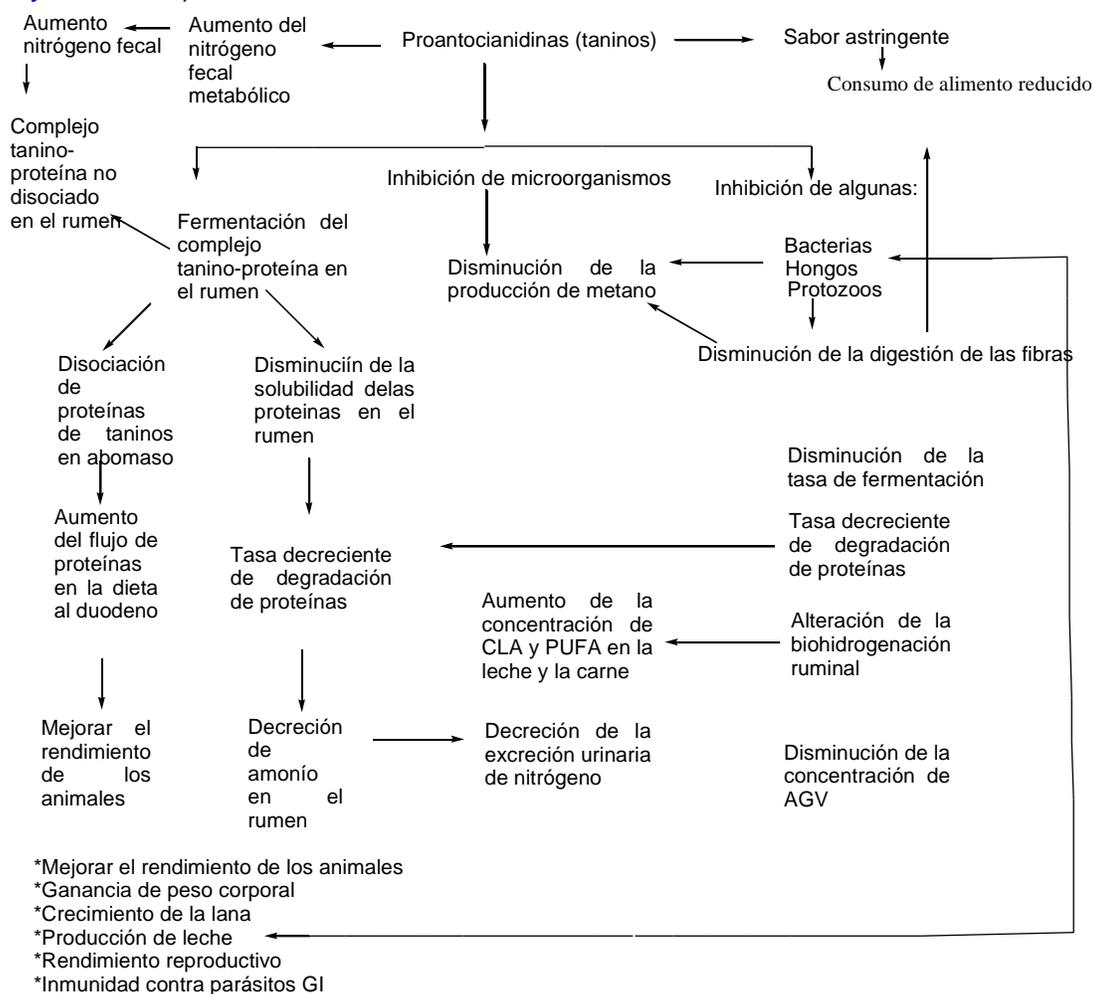


Figura 11. Representación esquemática de los efectos de las proantocianidinas (taninos) sobre el metabolismo ruminal y el comportamiento de los rumiantes. CLA: ácido linoléico conjugado; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; AGV: ácidos grasos volátiles (Patra y Saxena, 2010).

II.6.5 Efecto de los compuestos bioactivos en la absorción de aminoácidos intestinales

Las proantocianidinas forman complejos estables con proteínas de diferentes fuentes en un rango de pH que oscila entre 3.5 y 7.0, valores que se ubican en el rumen e íleon. La proteína se libera del complejo de proantocianidina en un ambiente ácido (pH <3; abomaso) y alcalino (pH >8; duodeno proximal). La presencia de proantocianidinas en la dieta da lugar a un aumento de la digestión y la absorción de aminoácidos en el intestino delgado de los rumiantes. Sin embargo la absorción de aminoácidos en el intestino delgado aumentará o disminuirá, dependiendo el grado de polimerización de la proteína, del complejo proantocianidina-proteína y del tipo de forraje que este consumiendo el rumiante, un ejemplo reportado es el complejo de proanocianidina-Rubisco, el cual fue menos fácilmente dissociado para tracto digestivo que el complejo con otras proteínas ([Jonker y Yu, 2017](#)).

II.6.6 Características generales de la producción de leche caprina en el mundo

La leche de cabra se produce ampliamente en África occidental, pero también en el Caribe y África central, generalmente para el consumo en el hogar. Comparada con la de las vacas lecheras, la curva de lactación de las cabras es más plana, con picos menos prominentes y una mayor persistencia. Algunas veces, la curva de lactancia puede tener dos picos debido a las fluctuaciones estacionales de disponibilidad de alimentos

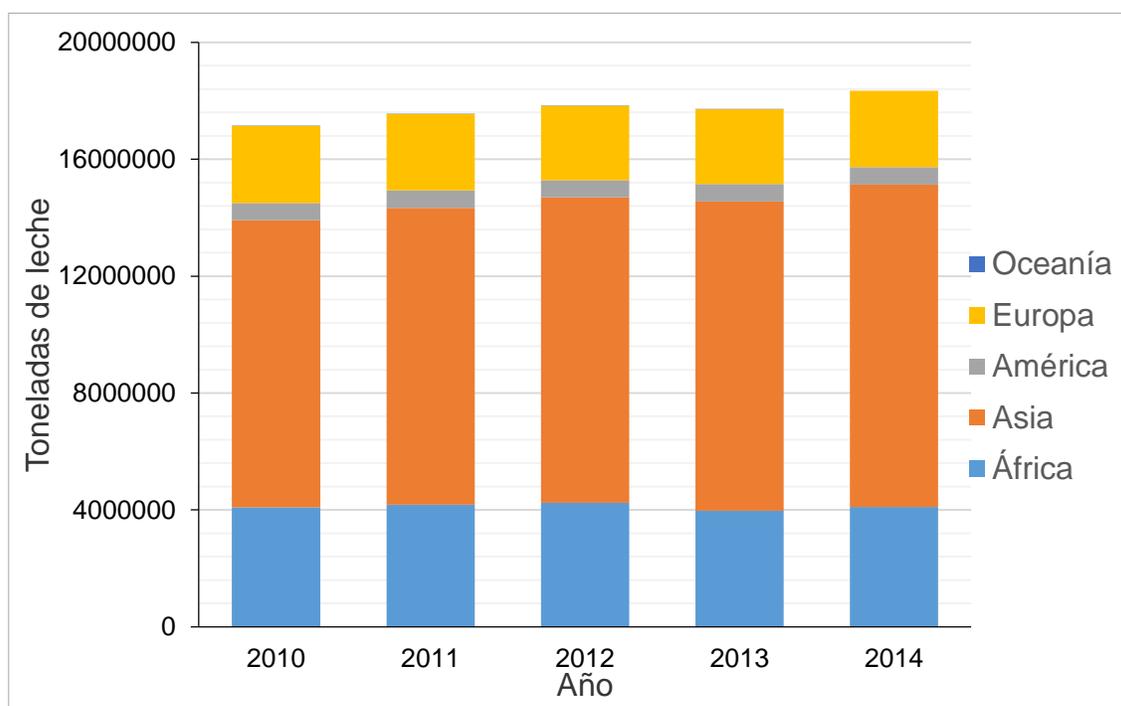
La mayor producción mundial de leche procede casi en su totalidad del ganado vacuno; aportando las cabras entre el 2 y el 2.5 % de la producción mundial ([Oliveros et al., 2009](#)).

Los principales países productores de leche de cabra son la India, Bangladesh y Pakistán. En la India, más del 90 por ciento de los pequeños rumiantes pertenecen a agricultores sin tierra o marginales.

Los rendimientos lecheros medios de las cabras varían considerablemente entre los principales países productores de leche. En Bangladesh, el rendimiento medio de producción es de aproximadamente 80 kg por año, mientras que en la India y Pakistán es de más de 140 kg por año.

La leche caprina representa una parte considerable de la producción lechera total en el África subsahariana (13 %) y en partes de Asia meridional, oriental y sudoriental (con la exclusión de China). Los países con más cabras lecheras son Bangladesh, la India y Malí (FAO, 2017).

Grafica 3. Producción mundial de leche caprina (FAOSTAT, 2017)



II.6.7 Características generales de la producción de leche caprina en México

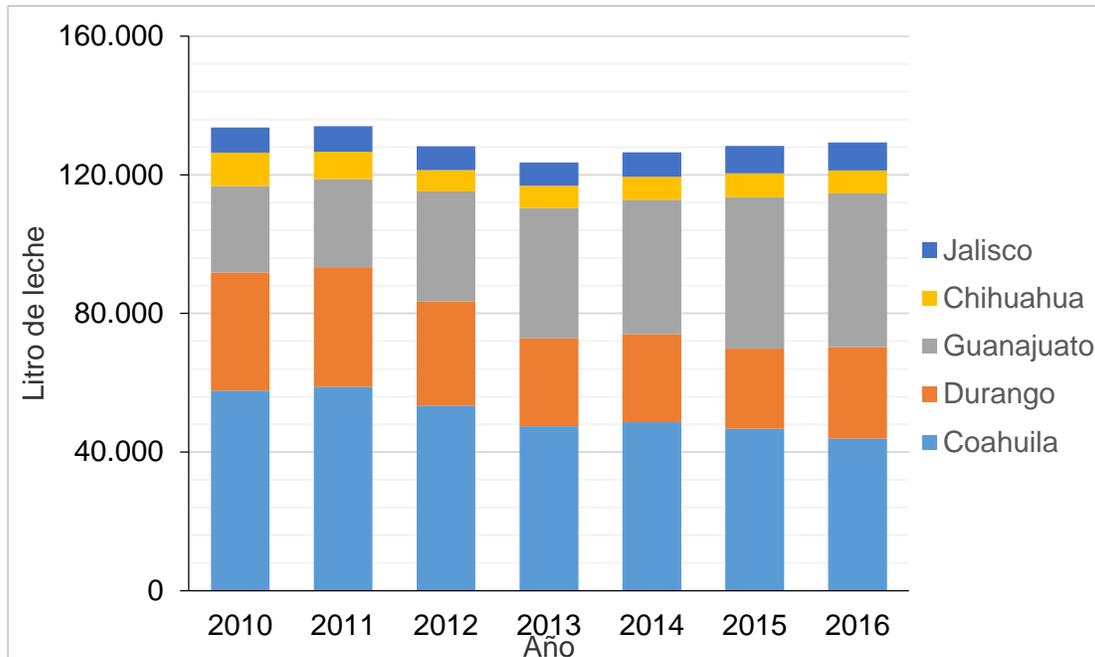
Originalmente las cabras fueron introducidas en México por los españoles, llegando las primeras a la región del Caribe y posteriormente se distribuyeron en todo el País. La mayor parte de los cabritos que se comercializan en México, provienen de razas lecheras o cruza con estas razas, con una aptitud cárnica pobre. En Estados del norte de México como Nuevo León y Coahuila, se prefieren los cabritos con pesos entre 7 y 11 kg, y menos de 30 días de edad, preferentemente con cúmulos de grasa peri-renal blanca y de textura característica de los animales alimentados únicamente con leche.



Figura 12. Cabras de la granja PUMA. Fotografía tomada por el autor.

Las principales razas de cabras lecheras en México son: Alpina, Saanen, La-Mancha, Nubia y Toggenburg. Cabe señalar, que en la zona centro y hacia el norte del país, las razas empleadas para mejorar la producción de leche son la Alpina, Nubia, Saanen y Toggenburg. Las unidades de producción de leche destinan entre el 20 % y 30 % de ese producto a la fabricación de quesos (artesanales, delicatessen o gourmet) y del 70 % al 80 % a la elaboración de dulces típicos como cajeta, glorias, obleas y flanes, entre otros productos. En la zona centro se produce tanto con razas especializadas, como con ganado criollo. Mientras que en la zona sur predomina el ganado criollo ([Mellado y García, 2014](#)).

Grafica 4. Producción nacional de leche caprina (SIAP, 2017)



Se le llama leche a la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro ([NOM-243-SSA1-2010](#)), en los países del Mediterráneo y en América Latina, la leche de cabra generalmente se transforma en quesos; en África y Asia meridional, se consume generalmente cruda o acidificada ([FAO, 2017](#)).

Las cabras en las zonas áridas del norte de México se mantienen para la producción de carne y leche. Gran parte de esta leche se utiliza para la producción de quesos y dulces. Dado que la leche con altos nutrimentos produce un mayor rendimiento de queso en comparación con la leche con menor proporción de nutrimentos, es importante para los productores, criar cabras un porcentaje adecuado de nutrimentos en la leche ([Mellado y García, 2014](#)).

La producción de leche constituye uno de los recursos más importantes para la obtención de ingresos en las regiones áridas de México, la leche de cabra es valorada por su eficiencia en la conversión del forraje a la leche y su capacidad de aprovechamiento de especies forrajeras que de otra manera podrían considerarse

improductivas. Sin embargo, los bajos rendimientos de la lactancia en los ecosistemas áridos de México se deben a las existencias genéticamente inferiores, la mala gestión de los rebaños, el alto valor de la vacunación y la disponibilidad de los animales silvestres. Se ha reportado que los nutrimentos son los más críticos para la producción de leche en ambientes hostiles. A pesar de estas circunstancias, las operaciones lecheras exitosas se encuentran en estas zonas áridas de México.

Una nutrición adecuada podría ayudar a los genotipos nativos a alcanzar su potencial genético, contrarrestar los efectos adversos de un entorno físico precario y minimizar los efectos de las malas prácticas de manejo. Es necesario prestar atención a la interacción entre la nutrición y la producción de leche en los ecosistemas áridos, donde prevalecen las deficiencias nutricionales (Mellado *et al.*, 2006).

Cuadro 4. Composición química (%) de leche humana y de rumiantes

	Humana Badui, 2006	Vaca Zervas y Tsiplakou, 2011	Cabra
Sólidos totales	12.7	12.5	13.0
Gasa	4.10	3.50	3.50
Proteína	1.50	3.20	3.50
Caseína	0.60	2.60	2.80
Lactosa	6.71	4.70	4.60
Minerales	0.20	0.72	0.80
Ca (mg/L)	-	119	134
Energía (kcal/L)	-	700	650

Cuadro 5. Análisis químico nutricional de leche caprina (g/100g)

	Delgadillo, 2010
Humedad	87
Proteína cruda (N*6.38)	3.6
Extracto etéreo	4.10
Cenizas	-
Extracto libre de nitrógeno	4.40
Energía bruta (kcal/g)	69

II.6.8 Beneficios de la leche de caprina

La leche de cabra tiene una mejor digestibilidad, alcalinidad, capacidad de regular el pH y ciertos valores terapéuticos en la medicina y la nutrición humana ([Park et al., 2007](#)), los productos lácteos de cabra pueden ser una alternativa rentable a los productos lácteos de vaca debido a su sabor específico, textura, tipicidad y su imagen natural y saludable ([Raynal et al., 2008](#)), también se ha reportado que es esencial como fuente de proteínas y calcio de alta calidad en las zonas áridas, especialmente para las personas malnutridas ([Morand et al., 2007](#)).

La leche de cabra tiene un contenido ligeramente menor de lactosa que la leche de vaca, los contenidos de fósforo y calcio son generalmente muy similares en la leche de vaca, pero los contenidos de cloro y potasio son mayores en la leche de cabra. En la leche de cabra se ubican rastros de carotenoides, brindándole un color blanco característico. La grasa en la leche de cabra forma también glóbulos más pequeños que los de la leche de vaca, por lo que se recomienda para los lactantes y otras personas que experimentan dificultad para digerir la leche de vaca ([Zervas y Tsiplakou, 2011](#)).

La leche de cabra parece ser un alimento perfecto, similar a la leche humana en la naturaleza. La proteína láctea se compone de proteínas de suero (20 %) y caseínas (80 %). Las proteínas de la leche de cabra son fuentes potenciales para la producción de péptidos bioactivos con diversas actividades biológicas. Los péptidos bioactivos pueden usarse como ingredientes funcionales en la formulación de nutracéuticos que mejoran la salud, y como fármacos potentes con un impacto positivo en las funciones corporales.

Entre las actividades biológicas que tienen las proteínas de la leche de cabra, están la influencia en la digestión, la resistencia a las enfermedades, las respuestas metabólicas a los nutrientes absorbidos, el crecimiento y el desarrollo de órganos específicos. Los péptidos tienen una amplia gama de funcionalidades fisiológicas que incluyen inmunoglobulinas, enzimas e inhibidores enzimáticos, estimuladores del crecimiento, proteínas de unión o portadoras, actividades antihipertensivas, antitrombóticas, antioxidantes y antibacterianas.

La leche de cabra contiene todos los aminoácidos esenciales sin gran cantidad de grasa. Cabe mencionar que la leche de cabra está tomando gran importancia porque la utilización de leche de vaca se ha convertido en una causa común de alergia en los lactantes. Es por esto que, las proteínas de la leche de cabra son más digeribles y se recomiendan para los bebés cuando falta la leche humana.

Los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) son particularmente interesantes porque pueden contribuir potencialmente a proteger contra el estrés oxidativo y las enfermedades asociadas tales como trastornos cardiovasculares. El principal factor de riesgo de enfermedad cardiovascular es la hipertensión. En este sentido, la enzima convertidora de la angiotensina I desempeña el papel principal y sus inhibidores están presentes naturalmente en la leche. Por lo tanto, los péptidos bioactivos derivados de la leche pueden servir como alternativa para los inhibidores sintéticos de la ECA ([Rani et al., 2017](#)).

II.6.9 Factores que interviene en la composición de la leche caprina

La composición de la leche varía en función de varios factores: el animal, raza, genética, fisiología, alimentación, características sanitarias de los animales, condiciones agroclimáticas, socioeconómicas y la tecnología de producción ([Morand et al., 2007](#); [Raynal et al., 2008](#); [Zervas y Tsiplakou, 2011](#)). En el caso de los pequeños rumiantes (ovinos y caprinos), se adaptan fácilmente a los ambientes rurales y son menos exigentes desde el punto de vista energético comparado con los animales de la especie bovina; por lo tanto, se están explorando ahora estrategias de alimentación basadas en recursos alimenticios alternativos a los granos, como el uso de frutos de arbustos, follaje de arbustos, pastos novedosos o productos agroindustriales ([Vasta y Luciano, 2011](#); [Zervas y Tsiplakou, 2011](#)). Cabe mencionar que en las zonas áridas de México; además, la producción de cabras se caracteriza por el pastoreo durante todo el año sin alimentación suplementaria, por lo que las cabras dependen únicamente de los recursos forrajeros de los pastizales altamente degradados ([Mellado, 2016](#)).

La alimentación es un factor importante, que domina fácilmente y sus resultados se pueden apreciar rápidamente. Además, cubre del 50 % al 70 % del costo de producción

por litro de leche de oveja o de cabra. Los dos sistemas principales de producción de pequeños rumiantes son los sistemas de pastoreo y de estabulación. Entre estos dos sistemas de producción hay un amplio espectro de sistemas mixtos donde se emplean pasto de verano, productos, subproductos agroindustriales, henos y silos forrajeros, alternativas empleadas en su mayoría durante el invierno; donde también se alterna el manejo alimenticio en pastoreo. En este sentido, resulta conveniente recordar que los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto o forraje; al degradar los hidratos de carbono estructurales del forraje, como la celulosa, hemicelulosa y pectina a través de actividad enzimáticas específicas de la población de bacterias, protozoos y hongos. La fisiología digestiva del rumiante adquiere características particulares, donde la digestión de los nutrimentos se restringe a la manipulación de su ecosistema microbiano para aumentar el rendimiento y la eficiencia animal. Los rumiantes proporcionan una relación sinérgica con los microorganismos, sus poblaciones no son estáticas y fluctúan con cambios en el ambiente ruminal y la dieta (Krehbiel, 2014).

II.6.10 Compuestos bioactivos en leche caprina

Existe un interés creciente por los compuestos secundarios presentes en plantas como herramientas para mejorar algunos aspectos de la calidad de la carne y la leche. Varios estudios han demostrado que la leche de ovejas y cabras en pastos se enriquece con sustancias de origen natural, debido a la presencia de compuestos bioactivos (Seigler, 2003; Manríquez *et al.*, 2007; Cuchillo *et al.*, 2010; Hannachi, *et al.*, 2011; Maldini *et al.*, 2011; RamLi *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2013a), se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos en la leche caprina, entre ellos fenoles simples o taninos condensados, saponinas o aceites esenciales ricos en terpenos (Vasta y Luciano, 2011), vitaminas liposolubles, ácidos grasos insaturados y ácido linoleico conjugado (Elgersma *et al.*, 2006; Zervas y Tsiplakou, 2011) entre otros.

II.7 Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu (FC) es un método analítico con buena reproducibilidad para determinación de polifenoles totales en materias biológicas. El reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) es una disolución de iones complejos provenientes de los heteropoliácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) en los cuales el molibdeno y tungsteno se encuentra en estado de oxidación 6^+ al reducirse por el grupo hidroxilo de los polifenoles habrá un cambio de coloración azul, la absorbancia se mide a 730 nm. La mezcla de RFC y compuestos fenólicos es estable en un ambiente ácido; siendo inestable en una solución alcalina. Por lo tanto, el carbonato de sodio, que se utiliza para proporcionar un entorno alcalino, es crítico para la reacción. El método FC depende de la oxidación selectiva de sustancias similares fácilmente oxidadas que contribuyen al contenido aparente de fenol total. Sin embargo estos resultados pueden verse afectados por otras moléculas reductoras no fenólicas, tales como azúcares, aminos aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y Fe^{2+} , además de otros enedíoles y reductones. La cantidad de polifenoles totales en una muestra se indica usualmente por su equivalente con el contenido relativo de catequina o ácido gálico, que se usan como los estándares cuantitativos (Chen *et al.*, 2015). A continuación se muestran algunos alimentos importantes en los últimos años por su contenido de polifenoles.

Cuadro 6. Polifenoles totales mg eq AG/L y mg eq AG/g en diferentes alimentos

Muestra	Polifenoles totales mg eq AG/L
Café	250-18000
Té verde listo para beber	40-170
Vino blanco (Chardonnay)	200.0
Vino rojo (Cabernet)	2000.0
	Polifenoles totales mg eq AG/g
Arándano (Northland)	3.98
Extracto de té verde	26.33
Café tostado (180°/15min)	27.02

Café tostado (180°/15min) (Kwak *et al.*, 2017); café, cascara de café, té verde para listo para beber (Heeger *et al.*, 2017); extracto de té verde (Nibir *et al.*, 2017); vino rojo (Malbec) y vino blanco (Chardonnay) (Lee *et al.*, 2011).

II.8 Cromatografía de capa fina

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en la química orgánica, la cual permite determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras o realizar el seguimiento de una reacción. En esta técnica se emplean adsorbentes ya sea óxido de aluminio (Al_2O_3) o dióxido de silicio (SiO_2) como fase estacionaria y una fase móvil orgánica; el Al_2O_3 o SiO_2 efectúan la separación principalmente por retención de los componentes sobre la superficie mediante una combinación de fuerzas de ácido de Lewis y base de Lewis, la acción capilar del adsorbente hace subir el disolvente desde la parte inferior de la placa, así se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente. Sin embargo los resultados pueden diferir debido a fenómenos muy complejos dentro de cámaras cromatográficas, causadas por las interacciones entre las fases cromatográficas y el aire de sus componentes, incluyendo vapor de agua, la efectividad de la fase móvil para eluir un componente a lo largo de la fase estacionaria depende del adsorbente, la mezcla de disolventes, así como de otras variables, tales como la temperatura, la superficie, la velocidad de flujo, la polaridad de la muestra, el disolvente y las fases en conjunto (Durst y Gokel, 2007) .



Figura 13. Técnica cromatográfica de capa fina. Fotografía realizada por el autor.

II.9 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

En la cromatografía de alta eficiencia, la muestra es inyectada al interior de la fase móvil, donde es soluble, siendo transportada a través de una columna con ayuda del flujo continuo de la fase móvil la cual es inyectada a alta presión. Dentro de la columna, se ubica una cubierta o fase estacionaria; siendo sus partículas de un pequeño diámetro, lo que le brinda una gran superficie de interacción. Este proceso cinético es conocido con el nombre de elución. La velocidad a la que un analito se mueve a través de la columna, con respecto a los demás presentes en la mezcla, está determinada por el tiempo que permanece en la fase móvil. La elección de la fase estacionaria y la fase móvil, del flujo al que se va a impulsar la fase móvil a través de la fase estacionaria e incluso de la temperatura a la que se va a realizar la cromatografía, permitirán una correcta separación del analito de otros compuestos. Este procedimiento se puede utilizar como técnica preparativa y como técnica analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación de un analito. Para identificar compuestos se debe seleccionar un sistema de detección que determine las diferentes propiedades físico-químicas de la molécula; es importante el tipo de separación y la naturaleza de la detección, la cual puede ser absorbancia, conductividad, fluorescencia, relación masa/carga, etc.

En la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, la fase móvil eluye de la columna durante un tiempo determinado conteniendo cantidades muy diferentes de solutos que pasan a través de un sistema de detección, el instrumento detecta la presencia del soluto que es convertida en una señal eléctrica y ésta puede ser tratada por un procesador de datos. Se representa la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución, y al gráfico obtenido se le conoce como cromatograma. Los solutos se representan gráficamente como una serie de picos que pueden identificarse por su ancho, altura o área. Para la cuantificación de compuestos se utiliza la señal del detector haciendo que sea proporcional a la cantidad o a la concentración inyectada del analito. Es preciso realizar previamente una curva de calibración para establecer el factor de respuesta como la pendiente de la medida del detector frente a las concentraciones de los calibradores. Para ello se realiza la inyección de una serie de

soluciones del compuesto con concentraciones conocidas para su detección, los cromatogramas obtenidos muestran una serie de picos cuyas áreas se correlacionan con la concentración del compuesto inyectado (Hernández, 2005).



Figura 14. Sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia. Fotografía tomada por el autor.

II.10 Capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH⁺)

La capacidad de atrapamiento del radical DPPH⁺ es uno de los más utilizados para evaluar la capacidad de los compuestos como captadores de radicales libres o donadores de hidrógeno y para evaluar la capacidad antioxidante de diversos compuestos. Este método se basa en la reducción del radical cromóforo DPPH⁺ que es de color violeta, por un antioxidante tal como los polifenoles, resultando la correspondiente hidracina DPPH-H que es de color amarillo pálido; lo que da lugar al cambio de coloración del radical, este cambio puede monitorizarse y cuantificarse mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de entre 515 y 520 nm (Barhé y Tchouya, 2016; Hidayat *et al.*, 2017).

La reacción entre los radicales DPPH⁺ y los compuestos antioxidantes en los extractos estudiados se debe a la presencia del electrón en el átomo de nitrógeno, debido a la deslocalización de este electrón, el DPPH⁺ es relativamente estable en su forma de monómero a temperatura ambiente. La deslocalización es también responsable del

color violeta característico del DPPH⁺. La eficiencia de un antioxidante se determina midiendo la reducción del color violeta causada por la recombinación de los radicales DPPH⁺. La captura de radicales libres por antioxidantes puede atribuirse a dos mecanismos:

- I. La liberación del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo (cinética rápida de ciertos ácidos y derivados fenólicos)
- II. La liberación de un electrón (cinética lenta de los derivados glicosilados y las antocianinas). En el caso de los compuestos fenólicos, el mecanismo principal es la captura de radicales libres mediante la captura del átomo de H por el DPPH⁺ para crear una molécula estable de DPPH-H ([Barhé y Tchouya, 2016](#)).

A continuación se muestran el porcentaje de inhibición del radical DPPH⁺ de algunos alimentos importantes en los últimos años importantes por su actividad antioxidante.

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición del radical DPPH⁺ en diferentes alimentos

Muestra	% de inhibición del radical DPPH ⁺
Arándano (Northland)	86.00
Café	63.39
Café tostado(180°/15min)	67.48
Vino blanco (Verdelho)	51.87
Vino rojo (Cabernet)	95.60

DB+30 % FAF = porcentaje de inclusión de los frutos de *Acacia farnesiana* sobre la dieta base; café tostado (180°/15min) ([Kwak et al., 2017](#)); café ([Wu, 2017](#)); vino rojo (Cabernet) ([Radovanović et al., 2009](#)); vino blanco (Verdelho) ([Paixão et al., 2007](#)).

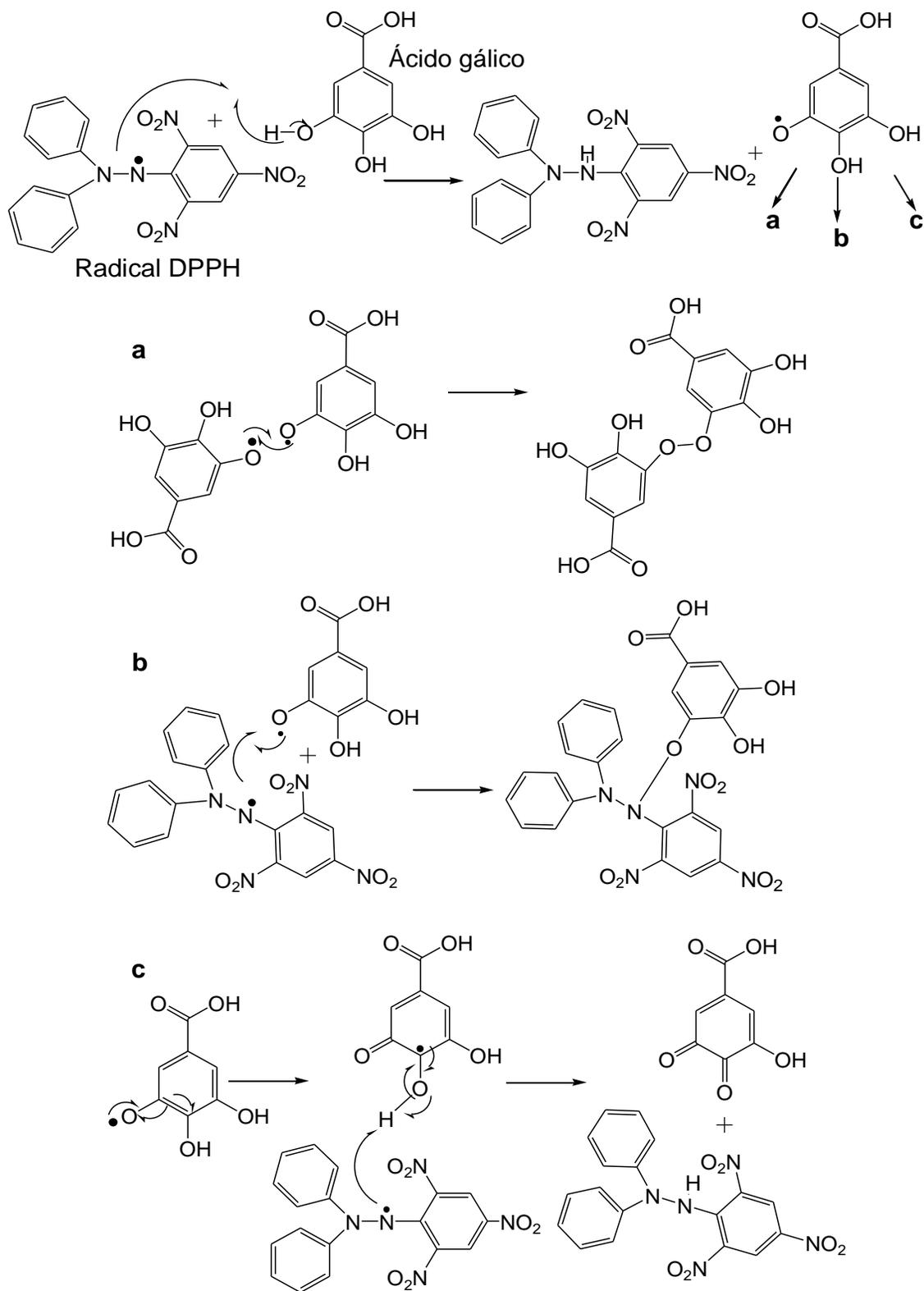


Figura 15. Varios trayectos de la reacción del radical DPPH⁺ con ácido gálico (ácido hidroxibenzoico). Mecanismo generado por el autor.

II.11 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

El ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno, es una medida útil de la capacidad antioxidante reportada para algunas muestras biológicas, suplementos y muestras de alimentos (Sáenz *et al.*, 2009), se basa en el barrido de radicales peroxilo generados por diclorhidrato 2,2'-azobis-[2-metilpropionamidina] (AAPH), eliminando el nitrógeno y dejando atrás dos radicales centrados en carbono (R•). En presencia de oxígeno, R• se convierte casi instantáneamente en radicales peroxilo (ROO•), que ataca a la fluoresceína que tienen fluorescencia o reacciona con antioxidantes los cuales impiden la degradación de la fluoresceína (Dudonné *et al.*, 2009; Schaich y Xie, 2015).

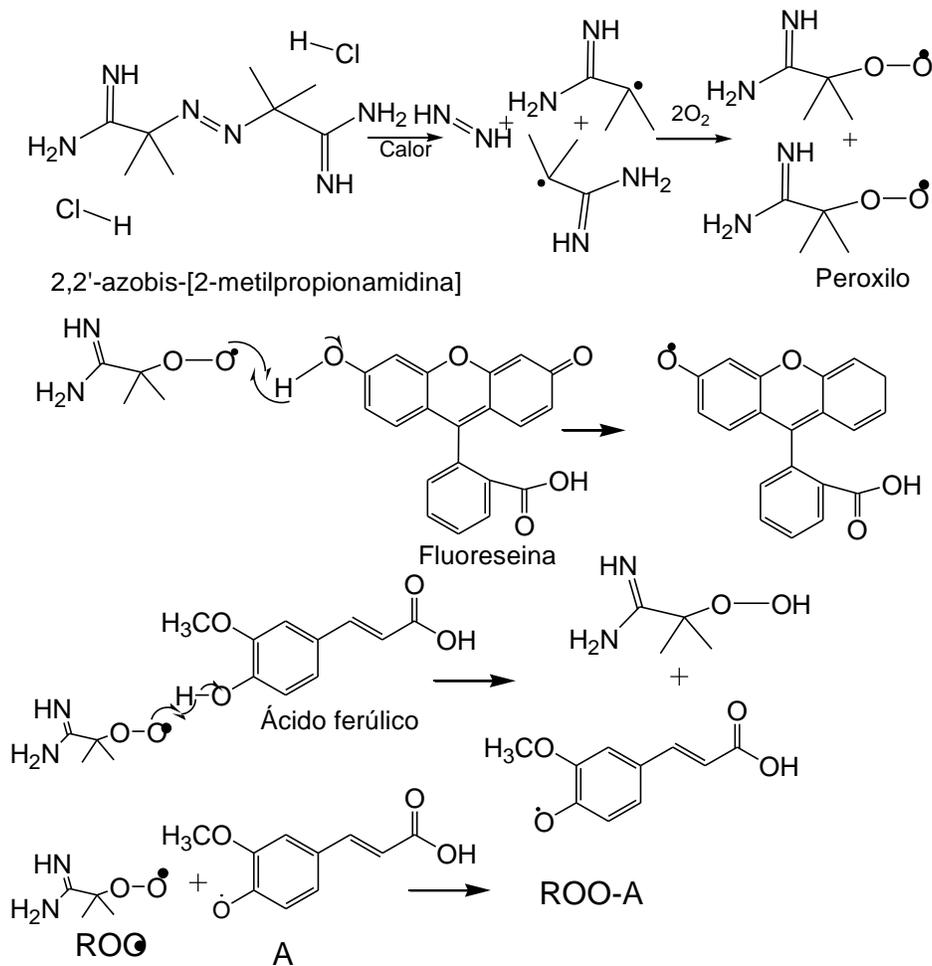


Figura 16. Reacción de APPH con fluoresceína y un antioxidante. Mecanismo generado por el autor.

El ensayo como ORAC proporciona herramientas importantes para la evaluación preliminar y la detección de antioxidantes. Sin embargo, la química de la reacción ORAC no está suficientemente bien definida en el progreso de la reacción o en la conexión a propiedades moleculares específicas. Las principales áreas problemáticas en química incluyen, la fluoresceína tiene reacciones secundarias, he interactúa consigo misma y con los fenoles por mecanismos no radicales, las concentraciones de los reactivos deben de conocerse bien y utilizarse de forma estandarizada y la existencia de moléculas que interactúan con los fenoles en ausencia de radicales y pueden contribuir a valores ORAC erróneamente altos ([Schaich y Xie, 2015](#)).

II.12 Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

Se ha demostrado que el ensayo FRAP es aplicable para valorar la capacidad antioxidantes de una amplia gama de compuestos; sin embargo, su velocidad de reacción y rendimiento final puede variar para cada compuesto antioxidante. El ensayo se basa en la capacidad del compuesto a evaluar para reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} . Esta reacción es controlada por sus interacción con la 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), que forma un color azul violeta cuantificado por su absorbancia a 593 nm ([Jones et al., 2017](#)).

En matrices alimenticias como la leche, la precipitación de la proteína a pH 3.6 puede resultar en una limitante en el análisis FRAP. Las proteínas precipitadas interfieren con la medición posterior de la absorbancia y pueden interferir con el rendimiento del ensayo ([Amamcharla y Metzger, 2013](#)).

III Objetivos

III.1 General

Identificar la presencia de compuestos bioactivos y determinar la actividad antioxidante de la leche de cabra, por efecto de la incorporación creciente (10 %, 20 % y 30 %) de los frutos de *Acacia farnesiana* en la alimentación animal, respecto de la leche proveniente de una dieta base, en contraste con la leche proveniente de la alimentación en pastoreo libre.

III.2 Particulares

Identificar y cuantificar los posibles compuestos bioactivos presentes en los cinco tipos de leche caprina [1) pastoreo libre (P); 2) dieta base (DB) compuesta por heno de alfalfa, ensilado de maíz y alimento concentrado comercial; 3) DB+10 % FAF; 4) DB+20 % FAF y 5) DB+30 % FAF], a través de la determinación de polifenoles totales (PT), cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Determinar la actividad antioxidante en los cinco tipos de leche caprina [1) pastoreo libre (P); 2) dieta base (DB); 3) DB+10 % FAF; 4) DB+20 % y FAF 5) DB+30 % FAF], a través de la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC), capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH⁺) y poder antioxidante reductor férrico (FRAP).

IV Justificación

En México existe una amplia diversidad de especies con potencial forrajero, tal es el caso de las *Acacia* en las cuales se han identificado aminas, alcaloides, aceites esenciales, cumarinas, di terpenos, ácidos grasos, triterpenos, fitoesteroles, saponinas, flavonoides, gomas, taninos hidrolizables y condensados. Específicamente en *Acacia farnesiana* (AF) se ha descrito la presencia de compuestos fenólicos como: quercetina, ácido gálico, glucósidos de flavonoides, metil galato, catequina y epicatequina. Éstos compuestos, por su naturaleza química pueden participar en la modulación de diversos procesos fisiológicos. Los frutos de AF son utilizados como recursos forrajeros no convencionales para alimentar al ganado. Por otra parte, el estrés oxidativo es un desequilibrio, que se da entre las especies reactivas en los organismos vegetales, animales e incluso el ser humano. Los compuestos polifenólicos son fitoquímicos que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, las propiedades biológicas de los polifenoles son diversas, presentan actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antialérgica, hepatoprotectora, antivirales, anticarcinogénica, vasodilatador y actúan como antioxidante. Es por eso que se busca conocer si la incorporación estratégica de los frutos de AF dentro de la alimentación de cabras lecheras puede modificar la presencia de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante; o que pudiera ser una excelente alternativa de integración dietaría.

V Hipótesis

Diversos estudios han reportado la presencia de compuestos bioactivos en *Acacia farnesiana* que pueden participar en la modulación de diversos procesos fisiológicos, debido a estos resultados se puede suponer que se observará variación en la proporción de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de la leche al incrementar la cantidad de la harina de los frutos de AF en la alimentación caprina.

VI Materiales y métodos

VI.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de la marca Sigma Aldrich: Ácido gálico (Cat. 67384), carbonato de sodio (Cat. S7795), DPPH (Cat. D9132), ácido clorogénico (Cat. C3878), ácido ferúlico (Cat. 128708), ácido cafeico (Cat. C0625), ácido sinápico (Cat. D7927), ácido cumárico (Cat. C9008), epicatequina (Cat. E1743), catequina (Cat. C1251), quercetina (Cat. Q0125), sulfato cérico (Cat. C9651), diclorhidrato 2,2'-azobis[2-metilpropionamida] (AAPH 97%) (Cat. 2997-92:4) y fluoresceína (Cat. F6377-500). Reactivos obtenidos de J.T. Baker Chemicals: Metanol grado HPLC (Cat. 9093-02), acetona grado HPLC (Cat. 9006-2), ácido clorhídrico (Cat. 9535), etanol absoluto (Cat. 90000-01). Reactivos obtenidos de Marca Mayer: Metanol (Cat. 0410), hexano (Cat. 1480), ácido fórmico (Cat. 130). Reactivo obtenido de Marca Maltinckrodt: Cloruro férrico (Cat. 5029). Reactivo obtenido de Calbiochem; Trolox® Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromo-2- carboxílico (Cat. 648471). Reactivo obtenido de marca Fluka: Folin-Ciocalteu (Cat. 47641).

VI.2 Animales y dietas

Se recolectaron 500 Kg de los frutos de *Acacia farnesiana*, estos fueron recolectados manualmente durante el mes de marzo del 2015 (época de estiaje) dentro del agostadero del rancho "Las Espinas", situado en Acatlán de Osorio, Puebla, México, ubicado entre los paralelos 18° 04' 24" y 18° 21' 30" de latitud norte y los meridianos 97° 55' 18" y 98° 11' 24" de longitud occidental. Las vainas de *Acacia farnesiana* fueron secadas durante 10 días sobre bastidores, protegidas de la luz; para garantizar la eliminación de humedad, los frutos fueron removidos 2 veces al día, los frutos secos fueron sometidos a una molienda empleando un molino de martillo hasta obtener una harina. Posteriormente se elaboraron las dietas experimentales como se muestran en Cuadro 8, estas se realizó en la granja Puma utilizando una mezcladora horizontal. Las dietas experimentales se almacenaron en bolsas de plástico, protegiéndose de la luz y permitiendo su aireación.

Para la obtención de las muestras de leche, se emplearon 50 cabras de raza Alpina Francesa (peso vivo promedio de 50 ± 5 kg), de primer y segundo parto (entre 2 y 3 años) los animales fueron separados en 5 grupos conformados por 10 animales cada uno, cada grupo recibió un tratamiento dietario distinto, los animales recibieron durante 10 días el manejo alimentario señalado, como periodo considerado de adaptación. La alimentación para las cabras en pastoreo consistió en dejarlas libres después de la colecta de leche y hasta las 4 pm, mientras que a los 4 grupos de cabras restantes se les dio el 50 % del alimento después de la ordeña a las 7 am y 50 % del alimento a las 4 pm. Las cabras se ordeñaron manualmente una vez al día a las 7:30 horas durante 7 días. La alimentación y recolección de leche se llevó a cabo en la granja Puma ubicada en el Municipio del Marqués en Querétaro, México ($20^{\circ}35'$ N, $100^{\circ}18'$ E. 1,950 metros sobre el nivel del mar) durante el verano de 2015), los animales en estabulación fueron albergados permanentemente en corrales separados dotados de un comedero lineal; por otra parte las cabras en pastoreo tuvieron un encierro nocturno. A todos los animales se les ofertó agua *ad libita*.

Los tratamientos dietarios fueron: 1) pastoreo libre (P); 2) dieta base (DB) compuesta por heno de alfalfa, ensilado de maíz y alimento concentrado comercial; 3) DB+10 % FAF; 4) DB+20 % FAF y 5) DB+30 % FAF, el porcentaje agregado de FAF fue sobre la dieta base. El tratamiento señalado como pastoreo correspondió al manejo de alimentación en pastoreo libre en un agostadero de 14 hectáreas clasificado como bosque espinoso caducifolio, compuesto por gramíneas: *Bouteloua curtipendula*, *Chloris virgata*, *Bothriochloa saccharoides*, *Leptochloa dubia*, *Rhynchelytrum roseum*, *Panicum obtusum*, *Bouteloua repens*, *Aristida adscensionis*, *Setaria parviflora*, *Urochloa fasciculata*, *Pennisetum ciliare*; leguminosas: *Prosopis leavigata*, *Acacia farnesiana*, *Acacia schaffneri*, *Mimosa biuncifera*; arbustos: *Celtis pallida*, *Psilactis brevilingulata*, *Jatropha dioica*, *Zaluzania augusta var. augusta*, *Lippia queretarensis*, *Verbasina serrata* y cactáceas: *Opuntia affasiacantha*, *O. amyctaea*, *O. hytiacantha*, *O. robusta*, *O. streptacanta*, *O. tomentosa*, entre otras (Galina et al., 1998).

Cuadro 8. Distribución de los insumos para las dietas experimentales (kg/animal)

Insumos	DB	P	DB +10 % FAF	DB +20 % FAF	DB + 30 % FAF
Heno de alfalfa	1.200	Pastoreo	1.080	0.960	0.840
Ensilado de maíz	0.800	libre sobre	0.729	0.648	0.567
Alimento	1.000	la			
concentrado		vegetación	0.891	0.792	0.693
comercial		de un			
FAF	-	bosque	0.300	0.600	0.900
Total	3.000	espinoso	3.000	3.000	3.000
		caducifolio			

FAF: Frutos de *Acacia farnesiana*; DB: dieta base constituida de heno de alfalfa, ensilado de maíz y alimento concentrado comercial; P: pastoreo; DB+10 % FAF; DB+20 % FAF; DB+30 % FAF: corresponden al porcentaje de inclusión de los frutos de *Acacia farnesiana* sobre la DB.

Cuadro 9. Análisis químico nutricional (g/100 g base seca) de concentrado comercial, ensilado de maíz y heno de alfalfa

	Concentrado Comercial	Ensilado de maíz	Heno de alfalfa	
	ABSI, 2017; Sánchez <i>et al.</i> , 2013a	Universidad de California; Rendón <i>et al.</i> , 2013; Nahum <i>et al.</i> , 2016	Toyes <i>et al.</i> , 2013	PANAR, 2017 Nahum <i>et al.</i> , 2016
Materia seca	87.08	35.9	92.53	89.45
Humedad	12.92	64.1	7.47	10.55
Proteína cruda	16	6.3	16.47	18.90
Extracto etéreo	2	2.6	1.1	-
Extracto libre de nitrógeno	44	-	34.61	-
Cenizas	12	5.5	12.25	11.10

VI.3 Muestras de leche caprina

Las muestras de leche colectadas de cada grupo de cabras correspondientes a los distintos tratamientos dietarios fueron envasadas por separado en 7 lotes definidos por los días de muestreo, el promedio de producción por día fue de 8.3 L. La leche fue congelada a -20 °C y para posteriormente liofilizada para garantizar su conservación; esta procedimiento fue realizado en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, para liofilizar se utilizó un equipo marca Usifroid, modelo SMH50 con las siguientes condiciones de proceso: congelación a -40 °C durante 6 h, secado primario a 20 °C durante 120 h con presión de 0.3 mbar, secado secundario a 37 °C durante 48 h con presión de 0.1 mbar.

VI.4 Análisis químico nutricional de la dieta animal

El análisis químico nutricional de las dietas de las cabras se realizó en el laboratorio de análisis químicos para alimentos del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se realizaron las siguientes determinaciones de acuerdo con la metodología descrita en AOAC (1990): porcentaje de humedad (método 934.01), proteína cruda (método 954.01), grasa o extracto etéreo (método 954.02), fibra cruda (método 968.10), cenizas (método 942.05). La energía bruta se determinó de acuerdo con la metodología descrita en ASTM (1974).

VI.5 Análisis químico nutricional de la leche caprina

El análisis químico nutricional de las muestras de leche se realizó en los laboratorios del área de análisis fisicoquímicos del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se realizaron las siguientes determinaciones: humedad empleando la metodología descrita en [NOM-116-SSA1-1994](#); proteína con el método descrito en [NMX-F-608-NORMEX-](#)

2012; grasa con el método descrito en [NMX-F-615-NORMEX-2004](#) y cenizas con el método [NMX-F-607-NORMEX-2012](#).

VI.6 Obtención de extractos de la leche caprina

Se pesaron 30 g de cada uno de los cinco tipos de leche liofilizada caprina por separado [1) pastoreo libre (P); 2) dieta base (DB) compuesta por heno de alfalfa, ensilado de maíz y alimento concentrado comercial; 3) DB+10 % FAF; 4) DB+20 % FAF y 5) DB+30 % FAF], se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron 100 mL de una solución metanol:agua (80:20 v/v), y se introdujo en un sonicador (Cole-Parmer) por 30 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se filtró usando papel filtro (Millipore #4) y recolectada en un matraz bola de fondo plano de 250 mL, posterior a esto, a la parte sólida se le añadieron 100 mL de una solución acetona:agua (70:30 v/v), se sonicó por 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se filtró usando papel filtro (Millipore #4), el filtrado se colocó con el obtenido en la primera filtración para posteriormente ser concentrados en un rotavapor (marca IKA modelo RV 10) empleando un baño de agua (IKA HB 10) a una temperatura de 35 a 40 °C, el extracto obtenido se colocó en tubos de ensayo y se le añadieron 8 mL de metanol para posteriormente colocar en 8 tubos Eppendorf, 1 mL en cada uno y centrifugar (centrifuga Eppendorf, 5804 R) a 44100 x g durante 15 min a 4 °C y finalmente el sobrenadante de cada tubo se resguardó en viales color ámbar para ser almacenados a 4 °C.

VI.7 Cuantificación de polifenoles totales (PT) en extractos de leche caprina por el método de Folin-Ciocalteu

Para la cuantificación de PT se colocaron 2 mL de cada uno de los cinco tipos de extracto de leche caprina por separado, aforando a 5 mL con una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 0.3 %, de esta solución se tomaron 100 µL y se depositaron en un vial ámbar al que se le adicionaron 2 mL de una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 2 %; se dejó reposar por 2 minutos, para finalmente agregarle 100 µL del

reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó reposar la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente colocar 1 mL de la solución en una celda de cuarzo para ser leída la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm empleando un espectrofotómetro UV/Vis (Thermo Spectron, 60S). El ensayo se realizó por triplicado para cada extracto. La concentración de polifenoles totales se calculó mediante la realización de una curva patrón para la cual se utilizó ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/muestra (g de extracto de leche seca, 100 g de extracto de leche seca, 100 mL de leche fluida y L de leche fluida).

VI.8 Identificación de compuestos fenólicos de los extractos de leche caprina por cromatografía en capa fina (CCF)

Para aproximarse a la identificación de los compuestos bioactivos de la leche caprina evaluada en este estudio, se emplearon placas de aluminio cubiertas de sílica gel (SIL G-25 UV₂₅₄) de 13 cm x 7 cm. A 1 cm de la base de la placa, se marcó una línea base donde se colocaron 30 aplicaciones capilares de cada uno de los cinco tipos de extracto de leche caprina por separado; así mismo fue colocada una aplicación capilar de cada uno de los siguientes estándares: ácido clorogénico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, catequina, epicatequina y quercetina (todos a una concentración de 1 mg/mL). Se utilizó una fase móvil conformada por metanol:hexano:ácido fórmico (6:4: 0.5 %); una vez eluidas las placas se retiraron de la fase móvil y se dejaron evaporar a temperatura ambiente los disolventes, usando una campana de extracción. Posteriormente la placa fue colocada en una cámara de luz UV (marca BIOX), realizando una toma fotográfica, que se presentará en la sección de resultados. Como parte de identificación de fenoles, la placa se reveló con una solución (3 % m/v) de sulfato cérico, se asperjó la solución dejando evaporarla, para posteriormente colocar la placa sobre una parrilla de calentamiento (60 °C/10 segundos). Este procedimiento se realizó por duplicado y fue repetido de manera independiente usando esta vez una solución (5 % m/v) de cloruro férrico. Una tercera ronda de evaluaciones fue realizada esta vez usando una solución (0.2 % m/v) del

radical libre DPPH⁺, una vez eluida y evaporado el disolvente la placa se colocó sobre una parrilla de calentamiento (60 °C/10 segundos), para identificar los posibles compuesto fenólicos además de evaluar indirectamente la actividad antioxidante cualitativa.

VI.9 Identificación de compuestos en extractos de leche caprina por cromatografía de líquido de alta eficiencia (HPLC)

Se utilizó un equipo cromatógrafo de líquido de alta eficiencia, HPLC 1260 Infinity, Agilent Technologies®, dotado con un automuestreador 1200, una bomba cuaternaria de fase reversa, detector de absorbancia y una columna C18 de 4.6 x 150 µm. Y un software Chem Station Edition 1.06. Las condiciones de HPLC para cada grupo de fenoles estudiados en cada uno de los cinco tipos de extracto de leche caprina se presentan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Condiciones para la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de leche caprina mediante HPLC

Condiciones	Ácidos fenólicos	Flavonoides
Temperatura de columna (°C)	25	25
Fase móvil	Metanol:ácido fosfórico 1M (23:77)	Agua desionizada:acetonitrilo:metanol:acetato de etilo:ácido acético glacial (89:6:1:3:1)
Volumen de inyección (µL)	30	30
Flujo de la fase móvil (mL/minuto)	1	1
Absorbancia (nm)	280	280
Tiempo de corrida (minuto)	40	15

VI.10 Determinación antioxidante cuantitativa de los extractos de leche caprina

a) Capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH⁺)

Para esta determinación cada uno de los cinco tipos de extracto de leche caprina por separado fueron evaluados sin diluir, colocándose en tubos Eppendorf 70 μ L del extracto de leche caprina y 50 μ L de una solución (2 mM en etanol) del radical DPPH⁺, agitándose por 2 minutos y posteriormente se agregaron 800 μ L de etanol absoluto, para incubar por 2 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo; se centrifugaron a 44100 x g por 2 minutos. Se tomaron 350 μ L de esta solución y fueron transferidos a celdas de plásticas de 96 pozos transparentes, se leyó absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. El análisis también se realizó empleando 70 μ L de Trolox a 1 mM como estándar de referencia siguiendo la misma metodología que la muestra experimental, es decir, el extracto de leche caprina en estudio. Se utilizó un lector de microplacas multimodo Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA). Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de actividad secuestrante del radical DPPH⁺. El procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada extracto y se utilizó una curva patrón de Trolox en concentración 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM.

b) Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

Se realizaron diversas diluciones de cada uno de los cinco tipos de extracto de leche caprina por separado, identificando que la dilución 1:250 para cada uno de los cinco tipos de extracto de leche caprina serían evaluados a través de este ensayo. Se colocaron 25 μ L del extracto de leche caprina, más 25 μ L de una solución APPH y 150 μ L de fluoresceína fueron transferidos a celdas plásticas de 96 pozos negras (marca Costar®). Inmediatamente la placa fue colocada en el lector Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA). Siendo leída cada minuto durante 1.5 horas a 37 °C empleando una longitud de excitación de 485 nm y una de emisión de 530 nm. El análisis también se realizó empleando 25 μ L de catequina a 1 mg/ mL como estándar

de referencia siguiendo la misma metodología que la muestra experimental, es decir, el extracto de leche caprina en estudio. La capacidad de atrapamiento de radicales oxígeno, fue monitoreada a través de la cinética del decremento de la fluorescencia. En la misma placa, pero en las primeras dos líneas se colocó una curva de calibración de Trolox, evaluándose concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 μM , a partir de la cual se interpolaron los valores de las muestras. Los valores fueron reportados en μM equivalentes de Trolox/muestra (g de extracto de leche seca, 100 g de extracto de leche seca, 100 mL de leche fluida y L de leche fluida). Este procedimiento se realizó por triplicado.

c) Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

Se realizó una dilución 1:10 para cada uno de los cinco tipos de extracto de leche caprina por separado y también se realizaron las lecturas para cada uno de los cinco tipos de extracto de leche caprina por separado, sin diluir. El análisis fue por quintuplicado para cada extracto de leche caprina junto con sus respectivas diluciones, se preparó el reactivo FRAP. Se colocó en tubos Eppendorf 30 μL del extracto de leche caprina y 300 μL de la solución FRAP, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo; se centrifugaron a 44100 x g por 2 minutos. Se tomaron 350 μL de esta solución y fueron transferidos a celdas de plásticas de 96 pozos transparentes, se leyó absorbancia a una longitud de onda de 593 nm utilizando un lector de micro placas multimodo Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA). El análisis también se realizó empleando 30 μL de Trolox a 1 mM como estándar de referencia siguiendo la misma metodología que la muestra experimental, es decir, el extracto de leche caprina en estudio. Se evaluó mediante una curva estándar de Trolox a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 μM , así mismo se leyó otra curva de Fe_2SO_4 a concentraciones de 0.05, 0.025, 0.1, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 μM , con el fin de comparar la mejor curva respecto a los resultados de las muestras. Los resultados se expresaron como la capacidad antioxidante de cada extracto en mM $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ de extracto.

VI.11 Análisis estadísticos

Los resultados de los análisis de las muestras de leche se agruparon de acuerdo con la dieta que recibieron las cabras. Se expresó el valor promedio de los resultados \pm desviación estándar. Se realizó el test de Kruskal-Wallis para $P < 0.05$, la comparación de medias se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18 (IBM Corporation, New York, EUA).

VII Resultados

VII.1 Análisis químico nutricional de las dietas

La composición química de las dietas con las que se alimentaron las cabras se muestra en el Cuadro 11, donde se destaca una concentración proteica similar entre las diferentes dietas experimentales. En relación al contenido energético, el tratamiento dietario donde se incorporaron 30 % los FAF registró el valor más bajo.

Cuadro 11. Análisis químico nutricional de las dietas (g/100 g)

	DB	DB +10 % FAF	DB +20 % FAF	DB +30 % FAF
Materia seca	98.02	97.69	98.17	96.35
Humedad	1.98	2.31	1.83	3.65
Proteína cruda (N*6.25)	15.00	15.38	14.98	13.85
Extracto etéreo	3.42	3.08	2.57	3.40
Extracto libre de nitrógeno	45.13	45.62	49.53	51.76
Cenizas	15.34	14.85	13.14	10.21
Fibra cruda	19.13	18.76	17.95	17.13
Energía bruta (kcal/g)	4.67	4.72	4.64	3.77

FAF: Frutos de *Acacia farnesiana*; DB: dieta base constituida por 40 % heno de alfalfa, 26.6 % ensilado de maíz y 33.3 % alimento concentrado comercial; DB+10 % FAF, DB+20 % FAF, DB+30 % FAF: corresponden al porcentaje de inclusión de frutos de AF sobre la DB.

VII.2 Análisis químico nutricional de la leche caprina

La composición de la leche caprina correspondiente a cada uno de los tratamientos dietarios que se muestra en el Cuadro 12, se observa que la leche proveniente del manejo alimentario de dieta base tuvo los valores más altos para extracto etéreo, hidratos de carbono y energía bruta, mientras que el valor de proteína cruda fue el más bajo. La leche proveniente del manejo alimentario de pastoreo tuvo el valor más alto de proteína cruda, la leche proveniente del manejo alimentario de dieta DB+30 % de los FAF tuvo los valores más altos para humedad y cenizas sin embargo tiene los valores más bajo de hidratos de carbono y energía bruta, así mismo la leche proveniente del manejo alimentario de DB+20 % de los FAF tuvo el valor más bajo para cenizas. No se observa tendencia en los parámetros evaluados, cabe mencionar que la energía disminuyó conforme se incrementó el porcentaje de inclusión de los FAF.

Cuadro 12. Análisis químico nutricional de la leche caprina (%)

	DB	P	DB +10% FAF	DB +20% FAF	DB +30% FAF
Humedad	88.1	88.39	88.42	88.63	89.09
Proteína cruda (N*6.38)	2.61	3.59	3.42	3.34	3.50
Extracto etéreo	3.98	3.36	3.55	3.25	2.84
Cenizas	0.75	0.78	0.79	0.69	0.85
Extracto libre de nitrógeno	4.55	3.88	3.82	4.10	3.72
Energía bruta (kcal/100g)	64.0	60.0	61.0	59.0	54.0

FAF: Frutos de *Acacia farnesiana*; DB: dieta base constituida de heno de alfalfa, ensilado de maíz y alimento concentrado comercial; P: pastoreo libre; DB+10 % FAF; DB+20 % FAF; DB+30 % FAF: corresponden al porcentaje de inclusión de frutos de AF sobre la DB.

VII.3 Obtención de los extractos de leche caprina

Los extractos se obtuvieron después de evaporar la mezcla de solventes, obteniéndose el extracto metanólico:acetónico:acuoso de cada uno de los tipos de leche. Cabe señalar que por cada 30 gramos de leche liofilizada se obtuvieron 3.9, 4.4, 4.6, 3.9 y 3.6 gramos de extracto correspondientes a los tratamientos denominados como dieta base, pastoreo libre, DB+10 % FAF, DB+20 % FAF y DB+30 % FAF (FAF corresponden al porcentaje de inclusión de frutos de *Acacia farnesiana*), respectivamente. Traduciéndose en un rendimiento porcentual de 13.0 %, 14.8 %, 15.3 %, 12.9 % y 12.1 %, respectivamente. Los valores más altos obtenidos fueron para el pastoreo libre y la dieta con inclusión de 10 % FAF.

VII.4 Cuantificación de polifenoles totales (PT) en los extractos de leche caprina

El contenido de PT de los extractos de leche caprina se muestra en el Cuadro 13; los resultados se expresan en diferentes concentraciones con el objetivo de tener un panorama más amplio de comparación. La cuantificación de PT se realizó a través de la interpolación de los valores de absorbancia de la muestra dentro de los valores de una curva de calibración de ácido gálico (Anexo IV). Como puede observarse el extracto de la leche proveniente de la dieta con inclusión de 30 % FAF es la que registro el valor más alto con 2.06 mg eq AG/g MS mientras que el extracto de la leche proveniente del manejo de alimentación dieta base, obtuvo el valor más bajo con 1.12 mg eq AG/g MS, sin embargo no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los extractos de la leche proveniente del manejo de alimentación de las dietas de 30 % FAF, 20% FAF y pastoreo.

Cuadro 13. Contenido de polifenoles totales (mg de equivalentes de ácido gálico) en leche caprina, expresado en diferentes concentraciones

Extracto de leche caprina	mg eq AG/g MS	mg eq AG/l leche
DB	1.12 \pm 0.12 ^c	159.42 \pm 16.79 ^c
P	1.56 \pm 0.20 ^{ab}	231.61 \pm 29.06 ^{ab}
DB+10 % FAF	1.29 \pm 0.18 ^b	179.78 \pm 24.85 ^b
DB+20 % FAF	1.51 \pm 0.19 ^a	200.63 \pm 25.62 ^b
DB+30 % FAF	2.06 \pm 0.44 ^a	305.50 \pm 65.34 ^a

MS: materia seca; DB: dieta base; P: pastoreo; DB+10 % FAF; DB+20 % FAF y DB+30 % FAF: porcentaje de inclusión de los frutos de *Acacia farnesiana* sobre la dieta base, respectivamente; eq AG: equivalentes de ácido gálico. ^{a,b,c}Valores entre filas de la misma columna con literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

VII.5 Identificación de compuestos fenólicos en los extractos de la leche caprina por cromatografía de capa fina

Cada uno de los extractos de leche obtenidos a partir de cada tratamiento dietario se sometió a un estudio cromatógrafo en capa fina, con la intención de identificar ácidos fenólicos y flavonoides, así como identificar cualitativamente su actividad antioxidante.



Figura 17. Cromatoplaqueta para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de leche caprina. Placa revelada con luz UV, donde CA: ácido cafeico; GA: ácido gálico; FE: ácido ferúlico; SI: ácido sinápico; CL: ácido clorogénico; CAT: catequina; EP: epicatequina; QUE: quercetina; FAF: frutos de *Acacia farnesiana*; DB: dieta base; P: pastoreo; 10 %: DB+10 % FAF; 20 %: DB+20 % FAF y 30 %: DB+30 % FAF. Imagen fotográfica generadas por el autor.

En la Figura 17 se observó cómo los extractos de leche caprina presentan dos compuestos que eluyen a la misma altura entre ellos y que el que queda a mayor altura eluyo a la altura del ácido clorogénico, mientras que el que queda en la parte inferior no eluyo a la altura de ningún estándar, también se observó que los compuestos eluidos no dejan una marca definida.



Figura 18. Cromatoplaca para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de leche caprina. Placa revelada con el radical DPPH⁺, donde CA: ácido cafeico; GA: ácido gálico; FE: ácido ferúlico; SI: ácido sinápico; CL: ácido clorogénico; CAT: catequina; EP: epicatequina; QUE: quercetina; FAF: frutos de *Acacia farnesiana*; DB: dieta base; P: pastoreo; 10 %: DB+10 % FAF; 20 %: DB+20 % FAF y 30 %: DB+30 % FAF. Imagen fotográfica generadas por el autor.

Con la finalidad de conocer la capacidad antioxidante de los extractos de leche caprina, se empleó como revelador el radical DPPH⁺. En la Figura 18 se observó que las áreas de color amarillo en cada uno de los extractos y estándares sobre la cromatoplaca, representan la neutralización del radical DPPH⁺ por los compuestos con actividad antioxidante, así se pudo observar que los extractos de leche registraron una actividad antioxidante; notándose de nuevo que eluyen a la misma altura que el estándar ácido clorogénico, además también se observó que los compuestos eluidos no dejan una marca definida.

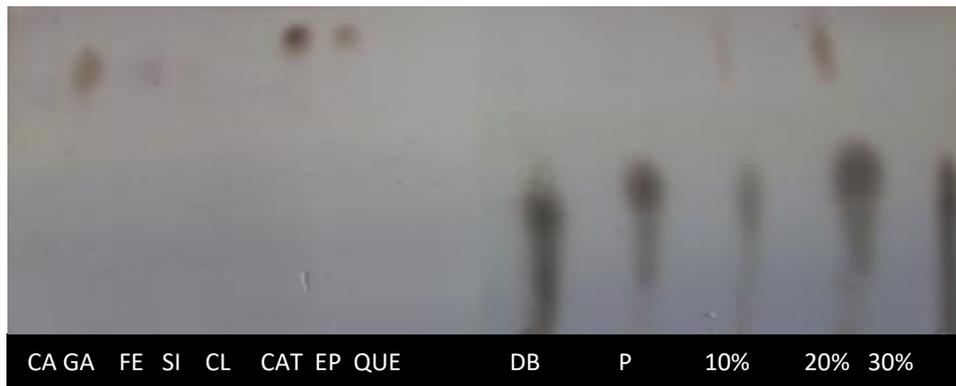


Figura 19. Cromatoplatea para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de leche caprina. Placa revelada con cloruro férrico, donde CA: ácido cafeico; GA: ácido gálico; FE: ácido ferúlico; SI: ácido sinápico; CL: ácido clorogénico; CAT: catequina; EP: epicatequina; QUE: quercetina; FAF: frutos de *Acacia farnesiana*; DB: dieta base; P: pastoreo; 10 %: DB+10 % FAF; 20 %: DB+20 % FAF y 30 %: DB+30 % FAF. Imagen fotográfica generadas por el autor.

En la Figura 19 se observa que los estándares empleados mostraron diferentes tonalidades de color café y marrón, algunos estándares no mostraron ningún color; sin embargo todos los extractos de leche registraron una coloración café. Siendo los extractos de la leche proveniente de la dieta de 10 % FAF y 20 % de FAF donde se observó tonalidad marrón a una altura mayor que la tonalidad café, haciéndose evidente la presencia de compuestos bioactivos, que pudieran coincidir con el comportamiento de los compuestos de los compuestos de referencia como Catequina, epicatequina y quercetina valorados en este ensayo.

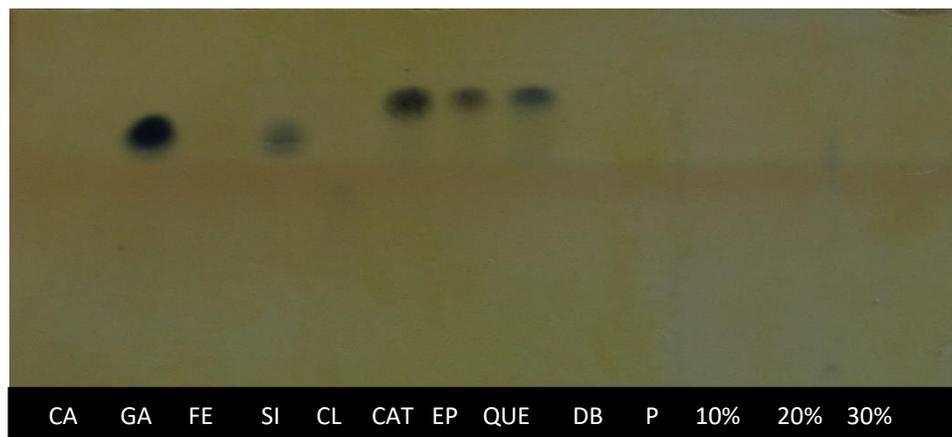


Figura 20. Cromatoplaca para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de leche caprina. Placa revelada con sulfato cérico, donde CA: ácido cafeico; GA: ácido gálico; FE: ácido ferúlico; SI: ácido sinápico; CL: ácido clorogénico; CAT: catequina; EP: epicatequina; QUE: quercetina; FAF: frutos de *Acacia farnesiana*; DB: dieta base; P: pastoreo; 10 %: DB+10 % FAF; 20 %: DB+20 % FAF y 30 %: DB+30 % FAF. Imagen fotográfica generadas por el autor.

En esta placa se puede observar que los estándares muestran tonalidades de colores grises y cafés en algunos casos en los estándares como CA, FE, CL no se puede observar ninguna coloración, así mismo los extractos de leche caprina tampoco registraron una coloración, a excepción del extracto de leche proveniente de la alimentación de pastoreo y de DB+20 % FAF en los cuales se observa una ligera coloración gris.

VII.6 Identificación de compuestos químicos en los extractos de leche caprina por HPLC

A partir de cada uno de los extractos de leche caprina se determinó la presencia de diferentes compuestos químicos, agrupándose en dos grupos: ácidos fenólicos y flavonoides. En cada grupo, se ubicaron diferentes estándares de referencia; para cada uno se realizó una curva de calibración, las cuales se muestran en el Anexo IV. Los tiempos de retención (TR) obtenidos para cada estándar se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Tiempos de retención obtenidos por HPLC para estándares

	Estándar	TR
Ácidos fenólicos	Ácido cafeico	11.38
	Ácido clorogénico	7.76
	Ácido ferúlico	30.85
	Ácido gálico	2.57
Flavonoides	Catequina	4.94
	Epicatequina	5.80
	Quercetina	4.22

Se observó que el TR máximo fue de 30.85 y 4.22 min para ácidos fenólicos y flavonoides respectivamente, con estos valores se determinó el tiempo de corrida en el equipo HPLC para cada uno de los extractos de leche a analizar. Se compararon los TR de los estándares con los diferentes picos que se obtuvieron en los cromatogramas de cada extracto de leche (Anexo V) para identificar si el compuesto podía estar o no en las muestras de leche para después calcular la concentración de estos con la curva de calibración correspondiente de cada estándar, los resultados se muestran en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Concentración (mg/100 g MS[†]; mg/100 mL de leche[§]) de diferentes compuestos bioactivos en leche caprina identificados por HPLC

Compuesto	Dieta Base		P		DB +10 % FAF		DB +20 % FAF		DB +30 % FAF	
	†	§	†	§	†	§	†	§	†	§
Ácido cafeico	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Ácido clorogénico	NI	NI	10.70 ±9.45 ^a	1.23 ±1.09 ^a	2.50 ±2.73 ^b	0.29 ±0.31 ^b	4.94 ±2.90 ^b	0.570 ±0.33 ^b	10.43 ±3.83 ^a	1.204 ±0.44 ^a
Ácido ferúlico	NI	NI	4.86 ±2.96 ^a	0.56 ±0.34 ^a	1.68 ±0.31 ^c	0.19 ±0.0 ^c	1.06 ±0.73 ^c	0.12 ±0.08 ^c	2.47 ±0.9 ^b	0.290 ±0.11 ^b
Ácido gálico	NI	NI	1.12 ±0.58 ^a	0.13 ±0.07 ^a	0.86 ±0.38 ^a	0.10 ±0.04 ^a	0.86 ±0.64 ^a	0.10 ±0.07 ^a	0.77 ±1.26 ^a	0.088 ±0.15 ^a
Catequina	NI	NI	3.65 ±3.14 ^a	0.42 ±0.36 ^a	0.95 ±2.73 ^c	0.11 ±0.02 ^c	1.14 ±0.29 ^b	0.13 ±0.03 ^b	1.26 ±1.06 ^b	0.15 ±0.12 ^b
Epicatequina	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Quercetina	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

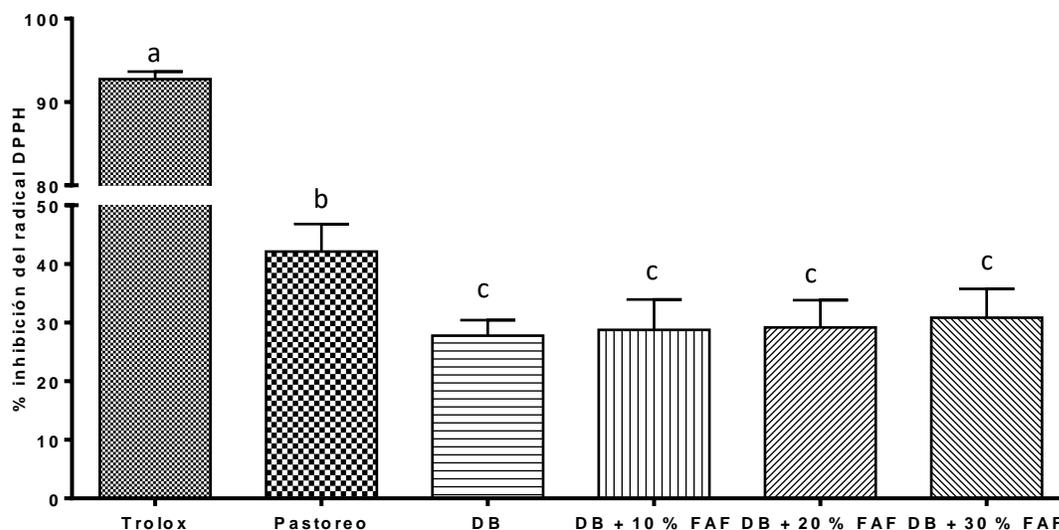
NI: No Identificado; MS: materia seca; DB: dieta base; P: pastoreo; DB+10 % FAF; DB+20 % FAF y DB+30 % FAF: porcentaje de inclusión de frutos de *Acacia farnesiana* sobre la dieta base respectivamente. † ^{a,b,c}Valores entre columna de la misma fila con literales diferentes indican diferencia estadística significativa (P<0.05), § ^{a,b,c}Valores entre columna de la misma fila con literales diferentes indican diferencia estadística significativa

En cuanto a la identificación de ácidos fenólicos, el más abundante en todos los extractos de leche fue el ácido clorogénico, ubicándose con una mayor concentración en el extracto de la leche de animales alimentados en pastoreo con 10.70 mg/100 g MS, sin embargo no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto al extracto de la leche de animales alimentados con una dieta base más la incorporación de 30 % de los FAF el cual fue de 10.43 mg/100 g MS. Para los ácidos ferúlico y gálico, los valores más altos fueron de 4.86 y 1.12 mg/100 g MS, respectivamente, para el extracto de la leche de animales alimentados en pastoreo, no habiendo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre todos los extractos de leche para el ácido gálico. Los valores más bajos obtenidos de ácido clorogénico y gálico se registraron para el extracto de la leche de animales alimentados con una dieta base más la incorporación de 10 % de los FAF los cuales fueron 2.50 y 0.86 mg/100 g MS, respectivamente, sin embargo no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre todos los extractos de leche para los ácido gálico y ferúlico, el contenido más bajo fue para el extracto de la leche de animales alimentados con una dieta base más la incorporación de 20 % de los FAF el cual fue de 1.06 mg/100 g MS, no encontrando ningún compuestos estándar en la dieta base.

En relación a la presencia de flavonoides en la leche, el compuesto más abundante cuantificable fue la catequina con una concentración de 3.65 mg/100 g MS, para el extracto de la leche de animales alimentados en pastoreo. Es importante destacar que de los siete compuestos evaluados bajo las condiciones señaladas en la sección de metodología ninguno de estos compuestos fue identificado en la leche procedente de las hembras caprinas que recibieron la dieta base y en ninguna dieta fueron encontradas la quercetina y epicatequina. El extracto de la leche de animales alimentados con una dieta base más la incorporación de 10 % de los FAF tuvo el menor valor de catequina siendo de 0.95 mg/100 g MS.

VII.7 Capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH⁺)

Los resultados no mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los extractos de la leche caprina donde se incorporaron a la dieta base 10 %, 20 % y 30 % de los FAF, así como en el extracto de la leche de animales alimentados con una dieta base. Registrándose una mayor estabilidad del radical DPPH⁺ con el extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación en pastoreo (42.11 %), siendo estadísticamente diferente ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos. El resultado obtenido para el estándar Trolox fue de 92.75 %, este compuesto se expresa con la finalidad de ver como se comportaron los extractos de la leche provenientes de los diversos sistemas de alimentación, con respecto a un compuesto con actividad antioxidante definida, se pudo observar que el extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación en pastoreo al ser el que registro la actividad más alta, inhibe casi el 50 % del estándar Trolox.



Grafica 5. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH⁺ por efecto de la leche caprina. Donde; DB: Dieta base; P: Pastoreo; DB+10 % FAF, DB+20 % FAF y DB+30 % FAF: porcentaje de inclusión de frutos de *Acacia farnesiana* sobre la dieta base respectivamente. ^{a,b,c}Valores con literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

VII.8 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

La capacidad con la cual los extractos de leche caprina absorbieron al radical oxígeno se muestra en el Cuadro 16. Donde se expresan en diferentes concentraciones con el objetivo de tener un panorama más amplio de comparación. La concentración de absorción del radical oxígeno de los extractos de leche caprina se realizó a través de la interpolación de los valores de absorbancia de la muestra dentro de los valores de una curva de calibración de Trolox (Anexo IV).

Cuadro 16. Capacidad de absorción del radical oxígeno (mg de eq Trolox) de los extractos de leche caprina, expresados en diferentes concentraciones

Extracto de leche caprina	mM eq de Trolox/g MS	mM eq de Trolox/l leche
DB	1.74 ±0.08 ^e	209.40 ±9.45 ^d
P	4.11 ±0.11 ^b	489.66 ±12.88 ^a
DB+10 % FAF	3.16 ±0.13 ^d	389.53 ±15.85 ^c
DB+20 % FAF	3.46 ±0.09 ^c	426.68 ±11.38 ^b
DB+30 % FAF	4.96 ±0.40 ^b	475.69 ±47.86 ^a
Epicatequina	38.48±3.35 ^a	-

MS: materia seca; DB: Dieta base; P: pastoreo; DB+10 % FAF; DB+20 % FAF y DB+30 % FAF: porcentaje de inclusión de frutos de *Acacia farnesiana* sobre la dieta base respectivamente. ^{a,b,c,d,e}Valores entre filas de la misma columna con literales diferentes indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

Se pudo observar que el extracto de leche proveniente del sistema de alimentación dieta base con la inclusión de 30 % de los FAF es la que registró el valor más alto con 4.96 mg e AG/g MS, mientras que el extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación de la dieta base registró el valor más bajo con 1.74 mg e AG/g MS, sin embargo no hubo diferencia significativa (P<0.05) entre el extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación dieta base con la inclusión de 30 % FAF y pastoreo.

VII.9 Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

En el Cuadro 17, se muestra la capacidad de reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} de los diferentes extractos de leche, donde se expresan en diferentes concentraciones con el objetivo de tener un panorama más amplio de comparación. La concentración de reducción de Fe^{+3} de los extractos de leche caprina se realizó a través de la interpolación de los valores de absorbancia de la muestra dentro de los valores de una curva de calibración de Fe_2SO_4 (Anexo IV). Donde se destaca una importante actividad reductora del extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación dieta base con la inclusión de 30 % de los FAF con una capacidad reductora del Fe^{+3} de 0.825 mL de $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{g MS}$, seguida del extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación de pastoreo con 0.557 mL de $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{g MS}$, registrándose la misma tendencia que en las pruebas antioxidantes anteriores. La capacidad reductora del Fe^{+3} más baja se encontró para el extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación dieta base con la inclusión de 10 % de los FAF la cual fue de 0.411 mL de $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{g MS}$, sin embargo no se registró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) respecto a los resultados obtenidos para el extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación de dieta base.

Cuadro 17. Capacidad de reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} (μM de Fe_2SO_4) de los extractos de leche caprina, expresados en diferentes concentraciones

Extracto de leche caprina	μM de $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{g MS}$	μM de $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{l leche caprina}$
DB	0.428 \pm 0.09 ^d	47.98 \pm 11.18 ^d
Pastoreo	0.557 \pm 0.15 ^c	61.85 \pm 17.25 ^c
DB+10 % FAF	0.411 \pm 0.01 ^d	47.24 \pm 1.51 ^d
DB+20 % FAF	0.492 \pm 0.09 ^c	56.63 \pm 11.41 ^c
DB+30 % FAF	0.825 \pm 0.12 ^b	92.42 \pm 13.59 ^b
Quercetina	1.383 \pm 0.38 ^a	1383.3 \pm 381.66 ^a

MS: materia seca; DB: Dieta base; P: pastoreo; DB+10 % FAF; DB+20 % FAF y DB+30 % FAF: porcentaje de inclusión de frutos de *Acacia farnesiana* sobre la dieta base respectivamente. ^{a,b,c,d}Valores entre filas de la misma columna con literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

VIII Discusión

VIII.1 Análisis químico nutricional de las dietas

La composición de la dieta base está conformada por heno de alfalfa, ensilado de maíz y alimento concentrado comercial, estas tres matrices en conjunto dan las características nutrimentales a la dieta, las cuales se describen en la Cuadro 10. Con respecto a la materia seca (MS), la inclusión de 10 %, 20 % de FAF no redujo la fracción de esta debido a que el heno de alfalfa y alimento concentrado comercial tiene un valor de MS (92.53, 87.07 g/100 g, respectivamente), similar al de *Acacia farnesiana* (94.22 g/100 g), mientras que ensilado de maíz tiene un valor de 35.9 g/100 g. Medir la MS es muy importante porque es lo que queda cuando el agua es eliminada del alimento, esta no contiene energía, mientras que la MS si, por lo tanto entre más MS y menos agua el alimento tendrá más energía para el animal ([Universidad de California, 2017](#)). La adición de 10 % de FAF no redujo el contenido de proteína cruda (PC), lo cual fue debido a que solo el 10 % de cada uno de los componentes de la dieta base fueron sustituidos por FAF los cuales tienen un contenido de 14.69 g/100 g de PC, sin embargo para las dietas donde se adicionó 20 % y 30 % de FAF disminuyó el contenido de PC, esto debido a que el contenido de PC de FAF es menor al de heno de alfalfa y concentrado comercial (18.90 y 16 g/100 g, respectivamente), dado que en estas dietas se redujo el 20 % y 30 % de cada uno de los componentes que conforman la dieta base la pérdida de PC fue mayor. El extracto libre de nitrógeno (ELN) aumento conforme aumento la adición de FAF esto debido a que los FAF tienen un contenido mucho mayor (69.19 g/100 g) al de heno de alfalfa y concentrado comercial (34.61 y 44 g/100 g, respectivamente). La cantidad de cenizas disminuyo con el incremento de FAF esto debido a que su contenido es menor (6.6 g/100 g) al de heno de alfalfa y alimento concentrado (12.25 y 12 g/100 g, respectivamente). La contenido de fibra cruda (FC) disminuyó con la incorporación de los FAF esto debido a que su contenido es menor (6.34 g/100 g), mientras que

para el heno de alfalfa, alimento concentrado y ensilado de maíz es de 28.1, 13.0 g/100 g y 23.5 respectivamente.

VIII.2 Análisis químico nutricional de la leche caprina

La composición de la leche está relacionada directamente con la composición de las dietas, por los mecanismos de transferencia de nutrimentos que se han mencionado en este trabajo, la dieta base elaborada con alimentos que normalmente consumen las cabras, las características nutrimentales de las dietas se describen en la Cuadro 11. El extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación dieta base comparada con [Delgadillo, 2010](#) reportó valores cercanos de: humedad 87 g/100 g, PC 3.6 87 g/100 g, EE 4.10 g/100 g, ELN 4.40 g/100g, lo que indica que esta leche proviene de una alimentación convencional.

Con respecto a la leche proveniente del sistema de alimentación de pastoreo el contenido de humedad, extracto etéreo y cenizas, se mantuvo igual que la leche proveniente del sistema de alimentación dieta base, sin embargo el valor de la proteína cruda se incrementó debido a que la alimentación en pastoreo expuso a los animales a una mayor diversidad de vegetación, con diferente composición que coincide con lo reportado [Di Trana y colaboradores en 2015](#), donde además reporta que puede mejorar el contenido de proteína cruda.

Para el caso de las leches provenientes de la inclusión de 10 %, 20 % y 30 % de FAF sobre la dieta base no se observó un cambio en los resultados con lo cual podemos inferir que la inclusión de los FAF no modificó la composición de nutrimentos de la leche de cabra. Es importante recordar que la transferencia de compuestos provenientes de la dieta a la leche, comienza con la masticación y la remasticación (rumia) de la planta, las células vegetales de esta, contienen proantocianidinas (PA) conjugadas a las proteínas, el entrar al rumen siguen dos caminos que se muestran en la figura 10, ([Jonker y Yu, 2017](#)).

VIII.3 Obtención de los extractos de leche caprina

Existen diversas técnicas de extracción que generalmente consumen mucho tiempo y requieren el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos tóxicos que pueden ser relativamente caros. La sonicación implica el uso de longitudes de onda de ultrasonido para diversos propósitos, recientemente, el uso de ultrasonido como ayuda para extracciones ha sido introducido como una nueva técnica de preparación de muestras para la extracción de compuestos orgánicos de matrices líquidas y sólidas. Esta técnica se basa en el uso de la energía ultrasónica para asegurar una mejor eficiencia en el contacto entre la muestra y el solvente de extracción, permitiendo rápidas extracciones de compuestos orgánicos en matrices líquidas y sólidas minimizando tanto el volumen de muestra procesada como el de solvente utilizado ([Morales, 2011](#)), este procedimiento permitió obtener importantes rendimientos (se mencionan en el inciso VII.3), tratándose de una muestra sólida.

VIII.4 Cuantificación de polifenoles totales (PT) en los extractos de leche caprina

Se ha reportado que la leche caprina obtenida de animales alimentadas con una dieta a base de un cereal y un forraje (30 % de concentrado de cereales o como ensilado de maíz y 70 % heno alfalfa) mostraron un perfil más alto en el contenido de polifenoles totales (Di Trana *et al.*, 2015), resultado que coincide con lo observado para el extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación dieta base con la inclusión de 30 % de los FAF en este ensayo, se observó que esta inclusión de 30 % de los FAF impacto positivamente sobre el contenido de polifenoles en relación al resto de los tipos de leche y con excepción del tipo de leche proveniente del sistema de alimentación en pastoreo. Previamente Delgadillo *et al.* (2015) y Cuchillo *et al.* (2013) reportaron un alto contenido de polifenoles totales (76 mg de eq AG/kg MS y 38.2 mg de eq AG/kg MS, respectivamente) en los frutos de AF; además de la presencia de diversos compuestos bioactivos como catequina y epicatequina, así como otros autores reportan la presencia de quercetina, ácido gálico, glucósidos de flavonoides (7-O- β -glucopiranosido de (2S) naringenina y 7-O- β -(4",6"-digaloiil glucopiranosido) de naringenina), metil galato, catequina epicatequina, (3 β , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol, tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxipropilo, β -D-glucopirano de (3 β , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo, pinitol, sacarosa, ácido digálico, galato de etilo, ácido elágico, naringina, kaempferol, naringenina, ácido málico, ácido cumárico, digalato de metilo, eriodictiol, acacetina, criseriol, ácido cítrico, taxifolina. (Seigler, 2003; Manríquez *et al.*, 2007; Cuchillo *et al.*, 2010; Hannachi *et al.*, 2011; Maldini *et al.*, 2011; RamLi *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2013b; Delgadillo *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2016; Hernández, 2017), estas características quizá influyeron positivamente a la transferencia de estos compuestos en la leche al incorporar estos recursos forrajeros alternativos a la alimentación caprina. Por otra parte, es importante recordar que estos compuestos bioactivos en las plantas son resultado de las rutas metabólicas durante el crecimiento y desarrollo vegetal (Manach *et al.*, 2004). Tal es el caso de las leguminosas como *Acacia farnesiana* y *Medicago sativa* las cuales como ya se mencionó son ricas en compuestos bioactivos, los

cuales tienen un proceso de biosíntesis complejo, el cual inicia con un aminoácido para continuar su proceso con una serie de enzimas y compuestos intermediarios dando como resultado la formación de flavonoides, isoflavonoides, flavonas, antocianinas y proantocianinas entre otros. Estos compuestos pueden ser transportados dentro y entre las células e incluso entre capas de tejido de la leguminosa (Gholami *et al.*, 2014). Cabe mencionar que la biosíntesis de estos compuestos es regulada por una serie de factores abióticos (luz, minerales del suelo, agua, aire, calor) los cuales determinan la concentración de estos, en cada una de las partes de la planta. Una vez dentro de las células vegetales, las cabras al consumir este recurso forrajero, da inicio a los procesos de metabolismo de estos compuestos, el cual estará regulado por varios factores como son: raza, genética, fisiología, alimentación, características sanitarias de los animales, condiciones agroclimáticas, entre muchos otros (Morand *et al.*, 2007; Raynal *et al.*, 2008; Zervas y Tsiplakou, 2011).

Cabe mencionar que los resultados obtenidos de contenido de polifenoles para la leche de cabra proveniente de un manejo de alimentación en pastoreo no mostraron diferencia significativa, respecto a la leche proveniente del sistema de alimentación dieta base con la inclusión de 30 % de los FAF. Lo que significa que el manejo de alimentación en pastoreo expone a los animales a una mayor diversidad de vegetación, donde la mayoría de los recursos son considerados como forrajes frescos sobre todo durante el verano, característica que puede mejorar el perfil de los compuestos bioactivos, así como su respuesta antioxidante; coincidiendo con lo señalado por Di Trana y colaboradores (2015); además con los resultados que previamente ha reportado Cuchillo *et al.* (2010) donde la alimentación de pastoreo influye en la presencia de este grupo de compuestos. Por otra parte, es importante mencionar que el ensayo de Folin-Ciocalteu es el más usado para determinar el contenido de polifenoles totales en alimentos, donde el grupo hidroxilo de los polifenoles reacciona con el molibdeno y tungsteno provenientes de una disolución de iones complejos como son los heteropoliácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico los cuales se encuentran en estado de oxidación 6^+ , sin embargo estos también pueden reaccionar con otras moléculas no

reductoras como: azúcares, aminos aromáticos, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y hierro²⁺, además de otros enodiolos y reductoras; compuestos que dependiendo de la matriz evaluada pueden interferir generando quizá un valor adicional al resultado de la reacción (Chen *et al.*, 2015). Comparando los resultados obtenidos con otros alimentos, la leche proveniente del sistema de alimentación de pastoreo y la inclusión de 30 % de los FAF sobre la dieta base tienen mayor contenido de polifenoles 231.6 y 305.5 mg eq AG/L respectivamente que el té verde listo para beber (Heeger *et al.*, 2017); y el vino blanco (Lee *et al.*, 2011), 170 y 200 mg eq AG/L respectivamente lo cual indica que se encuentra dentro de un panorama competitivo, así mismo un resultado con el cual se pudo comparar el contenido de polifenoles totales para la leche proveniente del sistema de alimentación en pastoreo fue el obtenido por Cabiddu *et al.* (2016) donde se obtuvo un contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu de 377.3 mg eq AG/L, el resultado fue mayor que el obtenido en este estudio, sin embargo fue muy parecido esto se debe a varios factores principalmente a que la vegetación pastoreada no es la misma, aunque si parecida debido a la presencia de arbustos, leguminosas, etc. También a la época del año ya que ese estudio se realizó en primavera, mientras que este estudio fue en verano y hay que recordar que algunos compuestos fenólicos están muy distribuidos mientras que otros son específicos de ciertas plantas y familias o solo se encuentran en ciertas etapas de desarrollo de la planta y en ciertas partes de la planta (Cheynier, 2012), debido a esto en el estudio se obtuvo un mayor valor ya que en primavera los frutos están frescos y los metabolitos secundarios están en mayor cantidad mientras que en verano el fruto ya está entrando a la época de senescencia y hay un cambio en su composición, sin embargo la leche proveniente del sistema de alimentación de pastoreo analizada en este estudio compite positivamente con respecto a la del estudio citado.

VIII.5 Identificación de compuestos fenólicos en los extractos de la leche caprina por cromatografía de capa fina

Como parte de la evaluación cualitativa a través del método de cromatografía en capa fina, donde se identificó la presencia de compuestos bioactivos en los extractos de leche caprina, (Figura 17), el uso de luz UV permitió identificar visualmente la presencia de compuestos que de acuerdo a la altura de su desplazamiento pudieron coincidir con el desplazamiento y la altura máxima del ácido clorogénico; este fenómeno no se repitió con ningún otro estándar de referencia utilizado. Sin embargo hubo compuestos que no se desplazaron por que quedaron sobre la línea de aplicación de la placa y que además se infiere que son varios porque no dejaron una marca definida, se puede inferir que los flavonoides se encontraban en su forma glicosilada y como agliconas libres, por tanto hubo una mezcla de estos compuestos los cuales al tener una polaridad similar no se separaron con la mezcla de disolventes que se empleó y quedaron en la base de aplicación de la placa; es importante mencionar que los estándares utilizados de flavonoides fueron como agliconas libres por lo cual los compuestos glicosilados no iban a eluir a la altura de los estándares. Es importante señalar que factores como las variaciones de temperatura del medio ambiente, de las proporciones utilizadas de los disolventes debido a polaridad e incluso se ha menciona que el grado de pureza de los solventes puede determinar los resultados ([Sharapin et al., 2000](#); [Komsta et al., 2016](#); [Liu et al., 2017](#)), lo cual no significa que las muestras de leche no contenga estos polifenoles u otros ya que al ser una técnica cualitativa es necesario confirmar con otro método más sensible como HPLC (resultados que se discutirán más adelante). En el caso de las placas reveladas con cloruro férrico se observó que los estándares presentaron coloraciones en tonos cafés y grisáceos que no lograron percibir en las muestras de leche provenientes de los sistemas de alimentación definidos como: DB, DB+10 % FAF y DB+30 % FAF, no obstante sí se observaron en las muestras de leche definidas como: P y DB+20 % de FAF, aunque la intensidad del compuesto fue definido como débil; esto pudo deberse quizá a la baja concentración de los

compuestos bioactivos en los extractos de leche; por lo que fue necesario colocar un mayor número de aplicaciones capilares de los mismos, para lograr observar una coloración más intensa.

VIII.6 Identificación de compuestos en extractos de leche caprina por cromatografía de líquido de alta eficiencia (HPLC)

Por otra parte, al evaluar el perfil de ácidos fenólicos y flavonoides a través de HPLC de las muestras de leche proveniente del manejo de alimentación en pastoreo, DB+10 %, DB+20 % y DB+30 % de los FAF en sustitución de la dieta base; se identificó una misma señal que coincidió con los tiempos de retención de los siguientes estándares: ácido clorogénico (ACI), ácido ferúlico (AFe), ácido gálico (AG) y catequina (Cat), mientras que la muestra identificada como DB no se encontró ningún ácido fenólico ni flavonoide; siendo la leche caprina proveniente de la alimentación en pastoreo la que presentó la presencia de ACI, AFe, AG y Cat en mayor proporción que el resto de las muestras de leche estudiados. Una vez más el efecto de transferencia de estos compuestos puede ser apoyado por los resultados reportados por [Cuchillo y colaboradores](#) en [2013](#) donde se hace referencia al contenido de ácidos fenólicos y flavonoides de especies endémicas de vegetación pastoreada por cabras; lo cual quizá influyó positivamente a la transferencia de estos compuestos en la leche caprina, coincidiendo con los otros estudios donde se incluyen forrajes frescos para mejorar el perfil de compuestos bioactivos en la leche ([Di Trana et al., 2015](#); [Jordán et al., 2010](#); [De feo et al., 2006](#)). Como se mencionó con anterioridad la muestra identificada como DB no se encontró ningún ácido fenólico ni flavonoide de los buscados en este estudio, lo cual no significa que no existan otras moléculas que puedan estar presentes en la DB y contribuir a los resultados obtenidos de actividad antioxidantes (que se muestran más adelante), al estar compuesta de ensilado de maíz se sabe este es rico ácido ferúlico ([Manach et al., 2004](#)), también al estar compuesta de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) se ha reportado en la literatura la presencia de saponinas y flavonoides en abundancia, lo cual no significa que todos los compuestos pasen

directamente a la glándula mamaria debido a que dependerá de la asociación de estos compuestos a las proteínas, es decir si la proteína tiene una estructura cuaternaria que es relativamente inestable, probablemente la proteína será más fácilmente precipitada por las proantocianidinas; las cuales también pueden unirse más fácilmente a una mezcla de proteínas, que con las proteínas individuales, esto debido a que ofrecen una mayor cantidad de sitios de unión ([Jonker y Yu, 2017](#)). Pasando así más fácil al intestino y siendo absorbidas con mayor facilidad, la concentración total reportado de flavonoides fue de 27 y 37 mg/g en peso seco ([Rafinska et al., 2016](#)), entre los encontrados están medicarpina y meleipurpina y se reporta que fueron identificados como posibles agentes antiproliferativos en varias líneas celulares tumorales ([Gatouillat et al., 2015](#)). Cabe mencionar que los polifenoles no son los únicos compuestos que pueden contribuir a la actividad antioxidante, existen enzimas antioxidantes, otro grupo son los antioxidantes no enzimáticos que no necesariamente provienen de la alimentación, como la proteína de unión a hierro lactoferrina; además de la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) ([Lindmark-Månsson y Åkesson, 2000](#)). Es importante señalar, que aun cuando en este ensayo estos compuestos no fueron evaluados, es posible que su presencia influya de manera positiva sobre la actividad antioxidante de la leche.

VIII.7 Capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH⁺)

Se realizaron dos pruebas para determinar la estabilidad del radical DPPH⁺ una fue cualitativa y la otra cuantitativa, la prueba cualitativa se realizó en cromatografía de capa fina, así cuando se empleó el radical DPPH⁺ para revelar la posible actividad antioxidante cualitativa de los 5 diferentes extractos de leche colocados en las cromatoplaca, se logró observar que la leche presentó una intensidad antioxidante ya que este compuesto se caracteriza por ser un radical libre “estable”, que por su deslocalización de electrones da lugar al color violeta intenso y al reaccionar con un sustrato como los polifenoles, que pueden donar un átomo de hidrógeno, entonces este da lugar a la forma reducida con la pérdida de color violeta a amarillo ([Alam et al., 2012](#)).

Posteriormente se realizó la prueba cualitativa, como se mencionó anteriormente la prueba de inhibición del radical libre DPPH⁺ es muy popular para determinar la actividad de barrido de radicales libres en muestras biológicas y que se basa en la aceptación de átomos de hidrógeno o electrones donados por antioxidantes ([Mann et al., 2016](#)). [Puga y colaboradores](#) en 2015 reportaron que el género *Acacia* es reconocido como una rica fuente de fitoquímicos sin embargo mencionan que el perfil de los frutos *Acacia farnesiana* no ha sido objeto de estudio completo, sin embargo en ensayos previos identificaron que los extractos de los frutos de AF mostraron un efecto protector sobre la capacidad de eliminación de radicales contra la formación de DPPH⁺ *in vitro*, esto es un antecedente para sospechar que las muestras analizadas en este estudio pudieran tener esta capacidad por la adición de *Acacia farnesiana* en la alimentación caprina, en este estudio se reportó una inhibición del 95.2 % superior al obtenido en este estudio el cual fue de tan solo 30.8 % pero no debemos olvidar que en este ensayo los extractos valorados son obtenidos de leche. Es también importante señalar que la capacidad de eliminación de radical DPPH⁺ en muestras de leche puede deberse a una reacción dual debido a la presencia de proteínas de la leche (proteína de suero y caseína) con la adición de enzimas y la reacción de Maillard, donde se reporta un

porcentaje de inhibición menor al 10 % (Oh *et al.*, 2013) inferior al obtenido en este estudio, también Oh y colaboradores en 2014 reportaron resultados de la capacidad de eliminación de radical DPPH⁺ evaluando la interacción de las proteínas con la lactosa de la leche, conocida esta interacción como la reacción de Maillard, o conocido también como pardeamiento no enzimático, la cual es una reacción compleja que se produce entre los grupos carbonilo del azúcar reductor y amina de la proteína (Fayle y Gerrard, 2002). Estos autores reportaron un porcentaje menor al 20 % para la interacción de lactosa con caseína y menor al 40 % para la interacción de proteína de suero con lactosa, pudiera pensarse que los resultados del porcentaje de inhibición de radical de DPPH⁺ de este estudio también están determinados por estas interacciones, que se ven favorecidas con el incremento de la temperatura y la reacción que ocurre en medio ácido o alcalino, siendo favorecida por las reacciones alcalinas (Barreiro y Sandoval, 2006), este fenómeno pudo verse mejorado ya que la leche de cabra registra valores de pH que oscila entre 6.5 y 6.8 (Park *et al.*, 2007). Por otro lado se pudo comparar el porcentaje de inhibición con el de otros alimentos, la leche proveniente del sistema de alimentación de pastoreo y la inclusión de 30 % de los FAF sobre la dieta base tienen menor porcentaje de inhibición 42.11 % y 30.82 % respectivamente que todos los alimentos evaluados pero muy corno al porcentaje de inhibición del vino blanco el cual fue de 51.87 % (Lee *et al.*, 2011), lo cual indica que los tipos de leche comparados se encuentran en un panorama competitivo si se toma en cuenta que la capacidad antioxidante de la leche está dada por la alimentación del animal, en la cual los alimentos que consuma pasaran por su sistema digestivo para poder encontrarse en la leche, mientras que las muestras comparadas se analiza el alimento por sí solo; además se compararon los 5 diferentes tipos de leche con el estándar Trolox, observándose que la leche proveniente del sistema de alimentación de pastoreo inhibe casi el 50 % del estándar por lo cual se confirma de forma positiva la capacidad inhibitoria de esta leche así como la leche proveniente del sistema de alimentación dieta base con la inclusión de 30 % de los FAF.

VIII.8 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

Existen numerosos métodos publicados que determinan la capacidad antioxidante total *in vitro*, que pueden clasificarse en dos tipos: ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la transferencia de electrones (ET). ORAC es un ensayo basado en HAT, este aplica un esquema de reacción competitivo, en el que el antioxidante y sustrato compiten por radicales peróxido generados térmicamente (Dudonné *et al.*, 2009). Como ningún método es suficiente, es necesario realizar más de un tipo de medición de la capacidad antioxidante para tener en cuenta las diversas vías de acción de los antioxidantes (Huang *et al.*, 2005; Prior y Cao, 1999).

Puga y colaboradores en 2015 reportaron una concentración de 1.561 mM eq de Trolox/L en *Acacia farnesiana* inferior al obtenido en este estudio para la muestra de leche identificada como DB+30 % FAF, el cual fue el valor más alto con respecto al resto de los tratamientos, se sugiere que además de la inclusión de los frutos de AF a la dieta caprina también hay intervención de otras moléculas las cuales aumentan la actividad antioxidante, las cuales pueden provenir de los componentes de la DB o como anteriormente se mencionó, los azúcares reductores pueden aumentar esta actividad, es importante mencionar que varios autores reportan que este método se emplea ampliamente ya que es altamente específico y capaz de responder a un mayor número de compuestos antioxidantes (Bucchini *et al.*, 2016), sin embargo, Ortega en 2017 reportó que existen algunas limitaciones relacionadas con la inyección de AAPH en las placas 96 pozos y esto puede ser responsables de una sobrestimación de la actividad antioxidante (ORAC) de aproximadamente 5 a 20 % si no se considera el retraso en la inyección de AAPH entre pocillos en la microplaca, entre otras limitación están que la fluoresceína tiene reacciones secundarias, se interactúa consigo misma y con los fenoles por mecanismos no radicales, las concentraciones de los reactivos deben de conocerse bien y utilizarse de forma estandarizada y la existencia de moléculas que interaccionan con los fenoles en ausencia de radicales y pueden

contribuir a valores ORAC erróneamente altos ([Schaich y Xie, 2015](#)). Es también importante resaltar que como parte del proceso metodológico de extracción de las muestras de leche, se realizó un vigoroso centrifugado del extracto para precipitar los componentes proteínicos, que pudieran interferir en la evaluación, por lo que ésta evaluación (ORAC) fue realizada únicamente empleando el sobrenadante de los extractos de leche.

Finalmente se pudo comparar los 5 diferentes tipos de leche caprina con el estándar epicatequina, observándose que la leche proveniente del sistema de alimentación de pastoreo inhibe aproximadamente el 10.7 % del estándar siendo el que presenta mayor capacidad de absorción de radicales oxígeno.

VIII.9 Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

Por otra parte, debido a que en la literatura se reporta la posibilidad de algunas limitaciones en las pruebas de actividad antioxidante se decidió realizar una tercera prueba para asegurar los resultados obtenidos, la metodología de FRAP ha sido ampliamente utilizada para determinar las capacidades antioxidantes de los extractos de plantas, y matrices alimenticias ya que requieren un equipo relativamente estándar y proporcionan resultados rápidos y reproducibles ([Dudonné et al., 2009](#)), [Feregrino-Pérez y colaboradores en 2011](#) reportaron una concentración de 1.85 mM $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ de extracto de *Acacia*, mientras que para las muestras de leche el valor más alto fue para la muestra de leche identificada como DB+30 % FAF lo que sigue confirmando que los compuestos bioactivos de *Acacia* pudiera estar teniendo un impacto positivo en la actividad antioxidante, los tres análisis antioxidantes realizados muestran resultados diferentes debido a las condiciones de cada ensayo pero la misma tendencia, la cual es que la muestra identificada como pastoreo registró la mayor actividad antioxidante seguida de DB+30 % FAF, DB+20 % FAF, DB+10 % FAF y finalmente DB, estos resultados coinciden con diversos estudios donde las cabras fueron alimentadas con forraje proveniente de leguminosas (*Sulla coronarium*, *Borago officinalis* L, *Crataegus oxyacantha* L, *Schinopsis lorentzii*.) donde los resultados obtenidos encuentran

una relación entre la ingesta de forrajera y los niveles de compuestos antioxidantes en la leche de cabra, en productos elaborados a base de esta y así como en la carne ([Addis et al., 2005](#); [De feo et al., 2006](#); [Bonanno et al., 2007a](#); [Bonanno et al., 2007b](#); [Larraín et al., 2007](#); [Moñino et al., 2008](#); [Molle et al., 2009](#); [Cuchillo et al., 2010](#); [Nieto et al., 2010](#); [Luciano et al., 2011](#); [Bonanno et al., 2011](#)), también se reporta que las dietas a base de forraje fresco más algún cereal son buenas fuentes de compuestos bioactivos ([De feo et al., 2006](#)), como la muestra identificada como DB+30 % FAF la cual después de la dieta identificada como pastoreo es la que muestra resultados más positivos.

Finalmente se pudo comparar los 5 diferentes tipos de leche caprina con el estándar quercetina, observándose que la leche proveniente del sistema de alimentación de dieta base con la inclusión de 30 % de los FAF inhibe aproximadamente el 7 % del estándar siendo el que presento mayor capacidad de reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} .

IX Conclusiones

Se determinó la presencia de compuestos bioactivos con la técnica de CCF, al revelar las placas con UV y actividad antioxidante al revelar las placas con DPPH⁺ por cambio de color.

En los cinco diferentes extractos de leche caprina, se cuantificó el contenido de polifenoles totales presentando un mayor contenido la muestra identificada como 30 % FAF.

Por medio de la técnica de HPLC se encontró que las muestras de leche caprina a excepción de la muestra identificada como DB, registraron la presencia de ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogénico y catequina.

Todas las muestras de leche presentaron la capacidad de atrapar al radical DPPH⁺, la muestra de leche caprina de pastoreo libre, tuvo mejor capacidad de atrapar el radical DPPH⁺.

Todas las muestras de leche caprina tuvieron una capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno, siendo la muestra de leche identificada como 30 % FAF la que tuvo la mejor capacidad de absorción.

La actividad antioxidante de los extractos de leche reportados en este estudio sugiere la posible transferencia de componentes antioxidantes por la adición de los frutos de *Acacia farnesiana*.

La incorporación de estos recursos no convencionales en la alimentación de los rumiantes debe evaluarse más a fondo para conocer todos los posibles compuestos bioactivos que pudieran influir en la actividad antioxidante de la leche caprina.

X Bibliografía

- Abbouyi, A. E., Toumi, M., El Hachimi, Y., Jossang, A. (2004). *In vitro* effects of aqueous seeds extract of *Acacia cyanophylla* on the opsonized zymosan-induced superoxide anions production by rat polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 159-165.
- ABSI. (2017). Línea de alimentos balanceados para cabras lecheras 16 % [En línea]. Disponible en: <http://www.absi2070.com.mx/alimentoparacaprinos.htm>. [Último acceso el 13 de septiembre 2017].
- Addis, M., Cabiddu, A., Pinna, G., Decandia, M., Piredda, G., Pirisi, A., Molle, G. (2005). Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid *cis* 9, *trans* 11. *Journal of Dairy Science*, 88, 3443–3454.
- Alam, N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, Md. (2012). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-145.
- Amamcharla, K. J., Metzger, E. L. (2013). Modification of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay to determine the susceptibility of raw milk to oxidation. *International Dairy Journal*, 34, 177-179.
- Arasaretnam, S., Ebenezer, R. J. (2017). Modification and cation adsorption studies of polyphenols extracted from *Acacia farnesiana*. Annual International Conference on Chemistry, Chemical Engineering and Chemical Process, Sri Lanka, 7-12.
- Avello, M., Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea Concepción*, 994, 161-172.
- Badui, S. (2006). *La Química de los Alimentos*. 4^{ta} Edición. Pearson Educación: Ciudad de México, 738 pp.

- Barhé, A. T., Tchouya, F. G. R. (2016). Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa L.*, *Glycine max L. Merr.*, yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(1), 1-8.
- Barreiro, J., Sandoval, A. (2006). Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Valle de Sartenejas, Baruta, estado Miranda: Equinoccio.
- Barrientos, R. L., Vargas, R. J., Rodríguez, R. A., Ochoa, R. H. G., Navarro, A. F., Zorrilla, J. (2012) Evaluation of characteristics of huizache (*Acacia farnesiana* (L.) Willd.) fruit for potential use in leather tanning or animal feeding. *Maderas y Bosques*, 18(3), 23-35.
- Benavides, E. J. (1999). Árboles y arbustos forrajeros: una alternativa agroforestal para la ganadería. En: Sánchez, M. D., Méndez. M. R. Agroforestería para la producción animal en América Latina. Roma, 1-513.
- Bernhoft, A. (2010). Bioactive compounds in plants, benefits and risks for man and animals. Noruega: Novus forlag, Oslo, 255 pp.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91, 179-194.
- Bonanno, A., Di Grigoli, A., Stringi, L., Di Miceli, G., Giambalvo, D., Tornambè, G., Vargetto, D., Alicata, M. L. (2007b). Intake and milk production of goats grazing *Sulla* forage under different stocking rates. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1), 605–607.
- Bonanno, A., Di Grigoli, A., Vargetto, D., Tornambè, G., Di Miceli, G., Giambalvo, D. (2007a). Grazing *Sulla* and/or ryegrass forage for 8 or 24 hours daily. Effects on ewes feeding behaviour. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Bonanno, A., Di Miceli, G., Di Grigoli, A., Frenda, A. S., Tornambè, G., Giambalvo, D., Amato, G. (2011). Effects of feeding green forage of *Sulla* (*Hedysarum coronarium* L.) on lamb growth and carcass and meat quality. *Animal* 5, 148–154.

- Bucchini, A., Scoccianti, V., Ricci, D., Giamperi, L. (2016). Cocomerina pear: and old and rare fruit with red pulp. Analysis of phenolic content and antioxidant/anti-inflammatory capacity. *CyTA–Journal of Food*, 14, 1-5.
- Cabiddu, A., Decandia, Mauro., Molle, G. (2016). Extensive ruminant production systems and milk quality with emphasis on unsaturated fatty acids, volatile compounds, antioxidant protection degree and phenol content. Servizio Ricerca per la Zootecnia, Sassari, Italy, 17 pp.
- Cárdenas, R. N., Pedraza, C. J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164-173.
- Chen, L., Cheng, C., Liang, J. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10–15.
- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2), 153-177.
- CONABIO. (2005). Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. *Acacia farnesiana*, Distribución potencial. [En línea]. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/layouts/dis_a_farngw.png. [Último acceso el 01 de Agosto 2017].
- CONABIO. (2017). Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. *Acacia farnesiana*. [En línea]. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/38-legum4m.pdf. [Último acceso el 21 de junio 2017].
- CONACyT. (2017). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Convocatoria 2017, Anexo B. Demandas específicas del sector 2017-4. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. [En línea]. Disponible en: <http://www.conacyt.gob.mx/index.php/sni/convocatorias-conacyt/convocatorias-fondos-sectoriales-constituidos/convocatoria-sagarpa-conacyt/convocatorias-abiertas-sagarpa-conacyt/2017-4-sagarpa-conacyt/14321-2017-04-sagarpa-conacyt-demandas/file>. [Último acceso el 28 de Agosto de junio 2017].

- Cuchillo, M., Delgadillo, C., Navarro, A., Pérez-Gil, F. (2010). Antioxidant capacity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing. *Journal of Dairy Research*, 77(1), 20-26.
- Cuchillo, M., Delgadillo, C., Navarro, A., Pérez-Gil, F. (2013). Chemical composition, antioxidant activity and bioactive compounds of vegetation species ingested by goats on semiarid rangelands. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 22(2), 106-115.
- Cuellar, J., Tórtora, J., Trejo, A., Román, P. (2012). *La producción caprina mexicana particularidades y complejidades*, Ariadna, Ciudad de México. 183 pp.
- De Feo, V., Quaranta, E., Fedele, V., Claps, S., Rubino, R., Pizza, C. (2006). Flavonoids and terpenoids in goat milk in relation to forage intake. *Italian Journal of Food Science*, 18(1), 85-92.
- Delgadillo, P. C. (2010). Tablas de composición nutricional: Leche y queso. *En: Muños, C. M. Composición de Alimentos*. D.F. Mc Graw Hill. 6.11.
- Delgadillo, P. C., Cuchillo, H. M., Espinosa, M. J. G., Campos, M. O., Jijón, M. E., Martínez, D. M. Izazaga, A. A. M., Solano, L. A. J., Chaverri, P. J. (2015). Antioxidant activity and protection against oxidative-induced damage of *Acacia shaffneri* and *Acacia farnesiana* pods extracts: *in vitro* and *in vivo* assays. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 435 pp.
- Di Trana, A., Bonanno, A., Cecchini, S., Giorgio, D., Di Grigoli, A., Claps, S. (2015). Effects of *Sulla* forage (*Sulla coronarium* L.) on the oxidative status and milk polyphenol content in goats. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 1-10.
- Dongnan, L., Bin, L., Yan, M., Xiyun, S., Yang, L., Xianjun, M. (2017). Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 84-93.
- Dragsted, L. O. (2008). Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *European Journal of Nutrition*, 47(2), 3-18.

- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mèrillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Durst, H. D., Gokel, G. W. (2007). Química orgánica experimental. Barcelona: Reverté, 599 pp.
- Elgersma, A., Tamminga, S., Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 207-225.
- Estrada, R. R., Ubaldo, S. D., Araujo, E. A. G. (2012). Flavonoids and central nervous system. *Salud Mental*, 35(5), 375-384.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Producción y Productos Lácteos. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/composicion-de-la-leche/es/#.WTGGz4WcHIU>. [Último acceso 02 de junio de 2017].
- Fayle, S. E., Gerrard, J. (2002). The Maillard Reaction. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 5 pp.
- Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I., Vargas-Hernández, M., Munguía-Fragozo, V. P., Loarca-Piña, F. G., Mendoza-Díaz, O. S., Ocampo-Velázquez, V. R., Rico-García, E., Guevara-González, G. R. (2011). Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia pennatula* pods. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 70, 859-864.
- Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). 2017, Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT). [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>. [último acceso 28 de Agosto de 2017].
- Galina, M., Puga, D., Hernández, A., Haenlein, G. (1998). Biodiverse and biosustainable production system with goats in Mexico: importance of a forage bank. *Small Ruminant Research*, 27(1), 19–23.

- García, C. A. C., Montiel, R. L. A., Borderas, T. F. (2014). Fat and protein of cow's milk: components, synthesis, and modification. *Archivos de Zootecnia*, 63, 85-105.
- García, L., Goñi, S., Olguín, P., Díaz, G., Arriaga, C. (2009). *Huizache (Acacia farnesiana)* whole pods (flesh and seeds) as an alternative feed for sheep in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 41(8), 1615–1621.
- Gatouillat, G., Magid, A. A., Bertin, E., El btaouri, H., Morjani, H. (2015). Medicarpin and millepurpan, two flavonoids isolated from *Medicago sativa*, induce apoptosis and overcome multidrug resistance in leukemia P388 cells. *Phytomedicine*, 22(13), 1186-1194.
- Gholami, A., De Geyter, N., Pollier, J., Goormachtig, S., Goossen, A. (2014). Natural product biosynthesis in *Medicago* species. *Natural Product Reports*, 31, 356-380.
- Gilbert, D. L., Colton, C. A. (1999). Antioxidant protection and oxygen radical signaling, (8), 189-218. *En: Gutteridge, J., Halliwell, B. Reactive oxygen species in biological systems*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- Halliwell, B. (2007a). Measurement of reactive species. *En: Halliwell, B., Gutteridge, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK, 777 pp.
- Halliwell, B. (2007b). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147- 1150.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (1999). *Reactive oxygen species in biological systems*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 695 pp.
- Hannachi, H., Elfalleh, W., Ennajeh, I., Laajel, M., Khouja, M., Ferchichi, A., Nasri, N. (2011). Chemicals profiling and antioxidants activities of *Acacia* seeds. *Journal of Medicinal Plants*, 5 (31), 6869-6875.
- Heeger, A., Cagnazzo, K. A., Cantergiani, E., Andlauer, W. (2017). Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of cascara beverage. *Food Chemistry*, 221, 969-975.

- Hernández, G. E. (2017). Aislamiento, caracterización estructural y determinación de las propiedades antibacterianas de los constituyentes de los frutos de *Acacia farnesiana*. tesis. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de ciencias químicas, México, 123 pp.
- Hernández, J. M. (2005). Cromatografía líquida de alta eficiencia. *Educación Continua del Laboratorio Clínico*, 8, 49-62.
- Hidayat, A. M., Fitri, A., Kuswandi, B. (2017). Scanometry as microplate reader for high throughput method based on DPPH dry reagent for antioxidant assay. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), 395–400.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- Jayatilake, G. S., Freeberg, D. R., Liu, Z., Richeimer, S. L., Blake, N. M. E., Bailey, D. T., Haridas, V., Gutterman, J. U., Isolation and structures of avicins D and G: in vitro tumor-inhibitory saponins derived from *Acacia victoriae*. *Journal of Natural Products*, 66, 779-783.
- Jones, A., Pravadali-Cekica, S., Dennisa, G. R., Bashirb, R., Mahonb, P. J., Shalliker, R. A. (2017). Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 967, 93-101.
- Jonker, Arjan., Yu, P. (2017). The occurrence, biosynthesis, and molecular structure of proanthocyanidins and their effects on legume forage protein precipitation, digestion and absorption in the ruminant digestive tract. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-23.
- Jordán, M. J., Moñino, M. I., Martínez, C., Afuente, A., Sotomayor, J. A. (2010). Introduction of distillate rosemary leaves into the diet of the Murciano-Granadina goat: transfer of polyphenolic compounds to goats' milk and the plasma of suckling goat kids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8265–8270.
- Komsta, L., Stepkowska, B., Skibinski, R. (2016). The experimental design approach to eluotropic strength of 20 solvents in thin- layer chromatography on silica gel. *Journal of Chromatography A*, 1483, 138-141.

- Krehbiel, R. C. (2014). Invited review: Applied nutrition of ruminants: Fermentation and digestive physiology. *The Professional Animal Scientist*, 30(2), 129-139.
- Kwak, S. H., Ji, S., Jeong, Y. (2017). The effect of air flow in coffee roasting for antioxidant activity and total polyphenol content. *Food Control*, 71, 210-216.
- Larraín, R. E., Richards, M. P., Schaefer, D. M., Ji, L. L., Reed, J. D. (2007). Growth performance and muscle oxidation in rats fed increasing amounts of high-tannin sorghum. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 85, 3276–3284.
- Leal, L. S. S., Silva, R. O., Araujo, T. S. L., Silva, V. G., Barbosa, A. L. R., Medeiros, J. V. R., Oliveira, J. S., Ventura, C. A. (2016). The anti-inflammatory and antinociceptive effects of proteins extracted from *Acacia farnesiana* sedes. *The Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 18(1), 38-47.
- Lee, G., Rossi, V. M., Coichev, N., Moya, D. H. (2011). The reduction of Cu(II)/neocuproine complexes by some polyphenols: Total polyphenols determination in wine samples. *Food Chemistry*, 126, 679-686.
- Lindmark-Månsson, H., Åkesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84(1), S103-S110.
- Liu, Y., Friesen, J. B., Grzelak, E. M., Fan, Q., Tang, T., Duric, K., Jaki, B. U., McAlpine, J. B., Franzblau, S. G., Chen, S., Pauli, F. G. (2017). Sweet spot matching: A thin-layer chromatography-based countercurrent solvents system selection strategy. *Journal of Chromatography A*, 1504, 46-54.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy*, 4(8), 118–126.
- Luciano, G., Vasta, V., Monahan, J. F., Lòpez-Andr ez, P., Biondi, L., Lanza, M., Priolo, A. (2011). Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of *longissimus dorsi* muscle from lambs fed a tannin-containing diet. *Food Chemistry*, 124, 1036– 1042.

- Maldini, M., Montoro, P., Hamed, A. I., Mahalel, A., Oleszek, W., Stochmal, A., Piacente, S. (2011). Strong antioxidant phenolics from *Acacia nilotica*: Profiling by ESI-MS and qualitative-quantitative determination by LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 228-239.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Mann, S., Shandilya U. K., Sodhi, M., Kumar, P., Mukesh, M. (2016). Determination of antioxidant capacity and free radical scavenging activity of milk from native cows (*Bos indicus*), exotic cows (*Bos taurus*), and riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*) across different lactation stages. *International Journal of Dairy Science and Processing*, 3(4), 66-70.
- Manríquez, J. J., Zúñiga, A., González, M., Torres, J. M. (2007). The antibacterial metabolites and proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 51(4), 228-231.
- Márquez, O. L., Calzada, T. R., Hernández, R. M., Cepeda, V. R. D., Ávila, A. J. G., Sandoval, P. A., Torres, R. J. (2011). Potential use of huizache (*Acacia farnesiana* L. Will) in phytoremediation of lead-contaminated soils. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 17, 11-20.
- Martínez, F. S., González, G. J., Culebras, M. J., Tuñón, J. M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Maslin, B. R., Orchard, A. E., West, J. G. (2003). Nomenclatural and classification history of *Acacia* (Leguminosae: *Mimosoideae*) and the implications of generic subdivision. [En línea]. Disponible en: <http://worldwidewattle.com/infogallery/taxonomy/nomencl-class.pdf> [Último acceso el 17 de mayo de 2017].
- Mellado, M. (2016). Dietary selection by goats and the implications for range management in the Chihuahuan Desert: a review. *The Rangeland Journal*, 38, 331-341.

- Mellado, M., Garcia, E. J. (2014). Effects of abortion and stage of lactation on chemical composition and mineral content of goat Milk from mixed breed goat on rangeland. *APCBEE Procedia*, 8, 1-5.
- Mellado, M., Rodríguez, S., Lopez, A., Rodríguez, A. (2006). Relation among milk production and composition and blood profiles and fecal P and nitrogen in goats on rangeland. *Small Ruminant Research*, 65, 230-236.
- Molle, G., Decandia, M., Giovannetti, V., Cabiddu, A., Fois, N., Sitzia, M. (2009). Responses to condensed tannins of flowering sulla (*Hedysarum coronarium* L.) grazed by dairy sheep. Part 1: Effects on feeding behaviour, intake, diet digestibility and performance. *Livestock Science*, 123, 138–146.
- Moñino, I., Martínez, C., Sotomayor, J. A., Lafuente, A., Jordàn, M. J. (2008). Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3363– 3367.
- Morales, B. F. M. (2011). Determinación de hidrocarburos en muestras de agua por extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido. [En línea]. Disponible en: <https://iuaca.ua.es/es/master-agua/documentos/-gestadm/trabajos-fin-de-master/maria-fernanda-morales.pdf>. [Último acceso el 13 de septiembre 2017].
- Morand, F. P., Fedele, V., Decandia, M. Le Frileux, Y. (2007). Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 20-34.
- Muñoz, Q. S., Olza, M. J., Gómez, L. C. (2012). Compuestos bioactivos en los alimentos de origen vegetal. En: Gil. A. *Tratado de nutrición*. Madrid: Panamericana 1-765
- Muthaura, C. N., Rukunga, G. M., Chhabra, S. C., Mungai, G. M., Njagi, E. N. M. (2007). Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 377–386.

- Nahum, M., Marín, M., Ríos, C., Meléndez, P. (2016). Milk fatty acids profile and metabolic indicators in postpartum dairy cattle fed with soiling or alfalfa silage under confinement system. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 48(1), 29-36.
- Nibir, M. Y., Sumit, F. A., Akhand, A. A., Ahsan, N., Hossain, S. M. (2017). Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(4), 352-357.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., Garrido, M. D. (2010). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Science*, 84, 23–29.
- Norma Mexicana. NMX-F-607-NORMEX-2012 Alimentos –Determinación de cenizas en alimentos. Método de prueba.
- Norma Mexicana. NMX-F-608-NORMEX-2011 Alimentos –Determinación de proteínas en alimentos. Método de prueba.
- Norma Mexicana. NMX-F-615-NORMEX-2004. Alimentos determinación de extracto etéreo (metodo soxhlet) en alimentos. Método de prueba.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-116-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o grasa.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-243-SSA1-2010, productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Oh, N. S., Lee, H. A., Lee, J. Y., Joung, J. Y., Lee, K. B., Kim, Y., Lee, K. W., Kim, S. H. (2013). The dual effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 1-13.
- Oh, N. S., Lee, H. A., Lee, J. Y., Joung, J. Y., Lee, K. B., Kim, Y., Lee, K. W., Kim, S. H. (2014). Preventive effect of fermented Maillard reaction products from milk proteins in cardiovascular health. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3300-3313.

- Oliveros, O. J., Morales, A. J. J., Andrade, M. H. (2009). Productive progress in a goat producers association, "caprinocultores unidos de Guanajuato AC", through a technology transfer system ggavatt (livestock validation and technology transfer group) (2001-2007). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 11, 165-170.
- Ortega, M. E., Zabalgoageazcoa, I., Vázquez de Aldana, R. B., Arellano, B. J. (2017). Solutions to decrease a systematic error related to AAPH addition in the fluorescence- based ORAC assay. *Analytical Biochemistry*, 519, 27-29.
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, C. J., Câmara, S. J. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*, 105, 204-214.
- PANNAR. (2014). Composición de alimentos y novillos en engorde. [En línea]. Disponible en: http://www.pannar.com.ar/downloads/tabla_novillos.pdf. [Último acceso el 13 de septiembre 2017].
- Papaefthimiou, E., Vagias, C., Couladis, M., Tzakou, O. (2017). Study of Volatile Components of *Acacia farnesiana* Willd. flowers. *Records of Natural Products*, 11:5, 474-478.
- Park, Y. W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88–113.
- Patra, A. K., Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry Reviews*, 71, 1198-1222.
- Pérez, M. (2011). La producción de leche. *En: Camara Nacional de Industriales de la Leche. El libro blanco de la leche y los productos lácteos*. México: CANILEC, 10-25.
- Pham, H. L., He, H., Pham, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.
- Prior, R. L., Cao, G. (1999). *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1173–1181.

- Quintanar, E. M. A., Calderón, S. J. V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89-101.
- Radovanović, A., Radovanović, B., Jovančićević, B. (2009). Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*, 117, 326-331.
- Rafinska, K., Pomastowski, P., Wrona, O., Górecki, R., Buszewski, B. (2016). *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochemistry Letters*, [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.006> [Último acceso el 20 de Junio de 2017].
- RamLi, S., Harada, K., Ruangrunsi, N. (2011). Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica del extracto etanólico de *Acacia farnesiana*. *Farmacognosia Diario*, 3(23), 50-58.
- Rani, S., Pooja, K., Pal, K. G. (2017). Exploration of potential angiotensin converting enzyme inhibitory peptides generated from enzymatic hydrolysis of goat milk proteins. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1-21.
- Raynal, L. K., Lagriffoul, G., Paccardb, P., Guillet, I., Chilliardc, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79, 57-72.
- Rendón, A., Cerbón, J., Maldonado, M., Quintanar, E. M. A., Calderón, S. J. V. (2007). Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicology in vitro*, 21, 1121-1126.
- Rendón, C. M. E., Noguera, R., Posada, O. S. L. (2013). Ruminal degradation kinetics of the corn silage with different levels of inclusion of vinasse. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), 44-51.
- Rojas, H. S., Quiroz, C. F., Camacho, D. L. M., Cipriano, S. M., Avila, M. B., Cruz, L. B., Jimenez, G. R., Villa, M. A., Abdelfattah, Z. M. Salem., Olivares, P. J. (2015). Productive response and apparent digestibility of sheep fed on nutritional blocks with fruits of *Acacia farnesiana* and *Acacia cochliacantha*. *Life Science Journal*, 12(2s), 81-86.

- Rojas, R. F., Torres, C. G. (2012). Árboles del valle central de Costa Rica: reproducción, Aromo (*Acacia farnesiana*). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 9(22), 66-67.
- Sáenz, T. A., Elisia, I., Innis, M. S., Friel, K. J., Kitts, D. D. (2009). Use of ORAC to assess antioxidant capacity of human milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 694-698.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2013). Evaluación de la calidad en la canal caprina. *Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal*. Querétaro, 110 pp.
- Sánchez, D. F., Moreno, P. C., Contreras, M. F., Morales, G. J. (2013a). Hydroponic wheat and barley fodder yields and their effect on weight gain in sheep. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 19(4), 36-43.
- Sánchez, E., Heredia, N., Camacho, C. M. del R., García, S. (2013b). Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholera* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 1307-1316.
- Schaich, M. K., Xie, J. T. X. (2015). Reprint of Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 18(B), 782-796.
- Seigler, D. (2003). Phytochemistry of *Acacia sensulato*. *Biochemical Systemics and Ecology*, 31, 845-873.
- Sharapin, N., Machado, R. L., Souza, C. E., Albuquerque, L. E. M., Valverde Macedo Dos S. E., Lopes de Almeida J. M. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá: CYTED, 246 pp.
- SIAP. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. 2017. Población ganadera, caprino. [En línea] Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/165999/caprino.pdf>. [Último acceso el 29 de Agosto de 2017].

- Toyes, V. E. A., Murillo, A. B., Espinoza, V. J. L., Carreón, P. L., Palacios, E. A. (2013). Chemical composition and vaccenic and rumenic acid precursors in five rangeland forage species in Baja California Sur, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4, 1-7.
- Universidad de California. Importancia de la Materia Seca y Cómo Medirla [En línea]. Disponible en: <http://www.absi2070.com.mx/alimentoparacaprinis.htm>. [Último acceso el 13 de septiembre 2017].
- Valares, C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis de Doctorado. Universidad de Extremadura. España, 211pp.
- Vasta, V., Luciano, G. (2011). The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, 101, 150-159.
- Velásquez, A. J., González, M., Perezgrovas, R., Bórquez, J. Domínguez, I. (2011). Production, digestibility and cost/benefit of lamb's diets including *Acacia farnesiana* pods. *Archivos de Zootecnia*, 60(231), 479-488.
- Wu, C. S. (2017). Modulation of the interface between polyester and spent coffee grounds in polysaccharide membranes: Preparation, cell proliferation, antioxidant activity and tyrosinase activity. *Materials Science and Engineering C*, 78, 530-538.
- Zervas, G., Tsiplakou, E. (2011). The effect of feeding systems on the characteristics of products from small ruminants. *Small Ruminant Research*, 101, 140-149.

XI Anexos

Anexo I. Extracción de leche

Cuadro 1. Datos obtenidos para la extracción de 30 g de leche caprina liofilizada

Extracto de leche caprina	Peso de matraz seco (g)	Peso de matraz con extracto (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
DB	107.3	111.2	3.9	13.1
P	107.2	111.6	4.4	14.8
DB+10 % FAF	108.2	112.8	4.6	15.3
DB+20 % FAF	106.3	110.1	3.9	13.0
DB+30 % FAF	106.4	110.0	3.6	12.1

DB: Dieta base; P: pastoreo; DB +10 % FAF; DB+20 % FAF y DB+30 % FAF: porcentaje de inclusión de frutos de *Acacia farnesiana* sobre sobre la dieta base respectivamente

Anexo II. Preparación de disoluciones

1. **Para CCF: DPPH⁺ (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) 0.2 % m/v.** Se pesaron 0.10 g de DDPH y se disolvieron en 50 mL de metanol.
2. **Sulfato cérico 3 % m/v.** En un matraz Erlenmeyer se pesaron 350 g de hielo y se agregaron 22.1 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó suavemente y posteriormente se agregaron 12.5 g de sulfato cérico, el matraz se colocó en una parrilla de calentamiento con agitación constante hasta la disolución completa del reactivo.
3. **Cloruro férrico 5 % m/v.** Se pesaron 5g de cloruro férrico y se disolvieron en 100 mL de etanol.
4. **HCl 3 % v/v.** Solución de 300 mL donde 9 mL fue del ácido clorhídrico grado reactivo y 291 mL de agua destilada temperatura ambiente
5. **Na₂CO₃ 2 % m/v.** Se pesaron 4 g de carbonato de sodio en 200 mL de agua destilada temperatura ambiente.
6. **Follin-Ciocalteu 1:1 v/v.** Solución total de 200 mL donde 100 mL fueron del reactivo de Folin y 100 mL de agua destilada temperatura ambiente.
7. **Para actividad antioxidante DPPH⁺ 2 mM en etanol.** 7.87 mg de DPPH⁺ en 10 mL de etanol.
8. **Solución AAPH.** Se pesaron 88.2 mg de 2,2'-azobis[2-metilpropionamidina], diclorhidrato en 2 mL de amortiguador de fosfatos (75 mM; pH 7.4)
9. **Fluoresceína.** (90 µL de fluoresceína 50 mM en 10 mL de amortiguador de fosfatos (75 mM; pH 7.4).
10. **Reactivo FRAP:** 2.5 mL de una solución de Fe⁺³ 20 mM (32.4 mg en 10 ml H₂O) mas 2.5 mL de TPTZ (31.2 mL en 10 mL HCl 40 mM) y 25 mL de amortiguador de acetatos (300 mM; pH 3.6)

Anexo III. Preparación de curvas patrón de estándares de ácidos fenólicos y flavonoides para análisis de HPLC.

Solución stock. Se pesó 5 mg de cada estándar y en un matraz se llevó al aforo con 5 mL de metanol, a partir de dicha solución se hicieron las diluciones de acuerdo al Cuadro 2.

Cuadro 2. Diluciones para estándares utilizados en la técnica HPLC

Volumen de solución stock (mL)	Volumen de fase móvil (mL)	Concentración final de estándar en fase móvil (mg/mL)	Concentración final de estándar en fase móvil (ppm)
1	0	1	1000
0.5	0.5	0.5	500
0.3	0.7	0.3	300
0.1	0.9	0.1	100
0.05	0.95	0.05	50

Anexo IV. Curvas de calibración

Figura 1. Curva de calibración de ácido gálico para determinación de polifenoles totales.

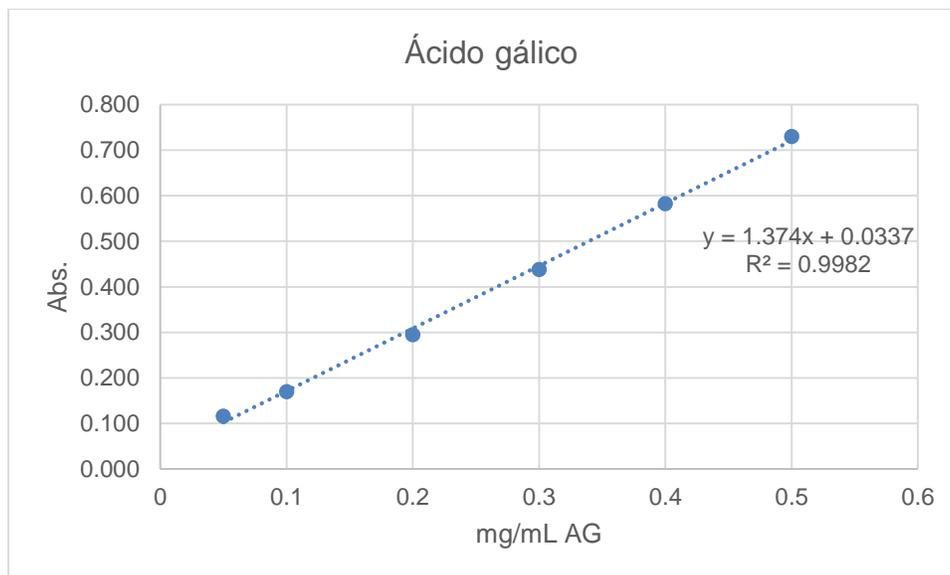


Figura 2. Curva de calibración de ácido cafeico como estándar de referencia en la determinación de HPLC para ácidos fenólicos.

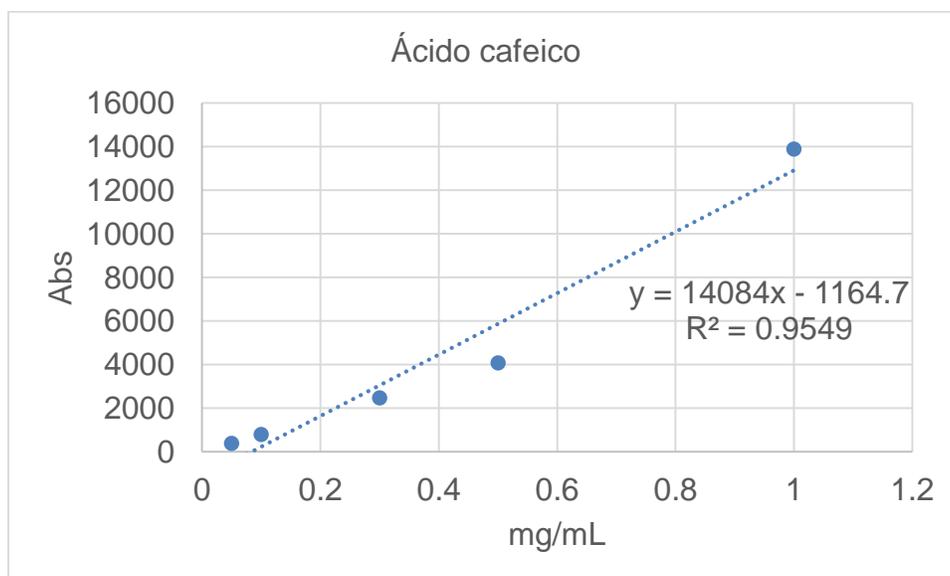


Figura 3. Curva de calibración de ácido clorogénico como estándar de referencia en la determinación de HPLC para ácidos fenólicos.

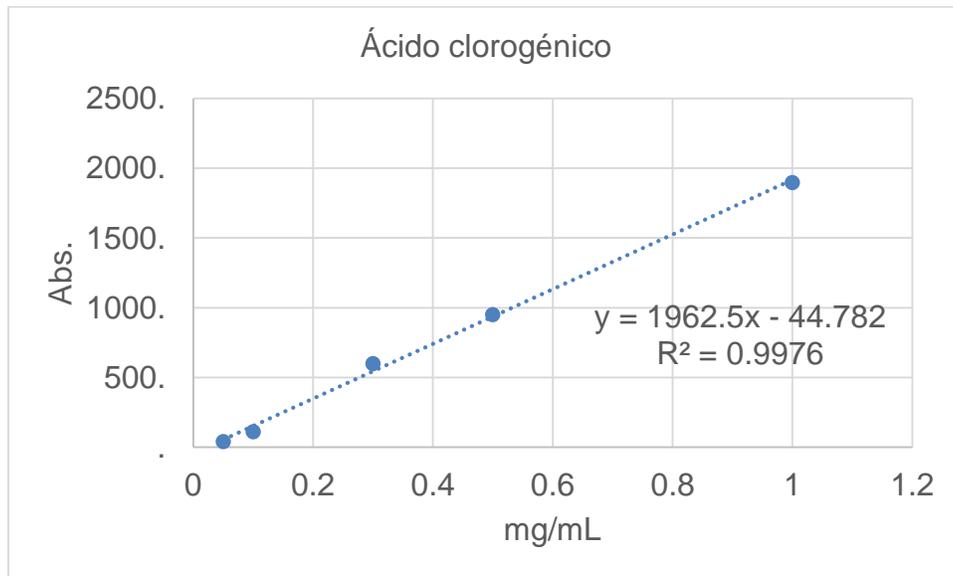


Figura 4. Curva de calibración de ácido ferúlico como estándar de referencia en la determinación de HPLC para ácidos fenólicos.

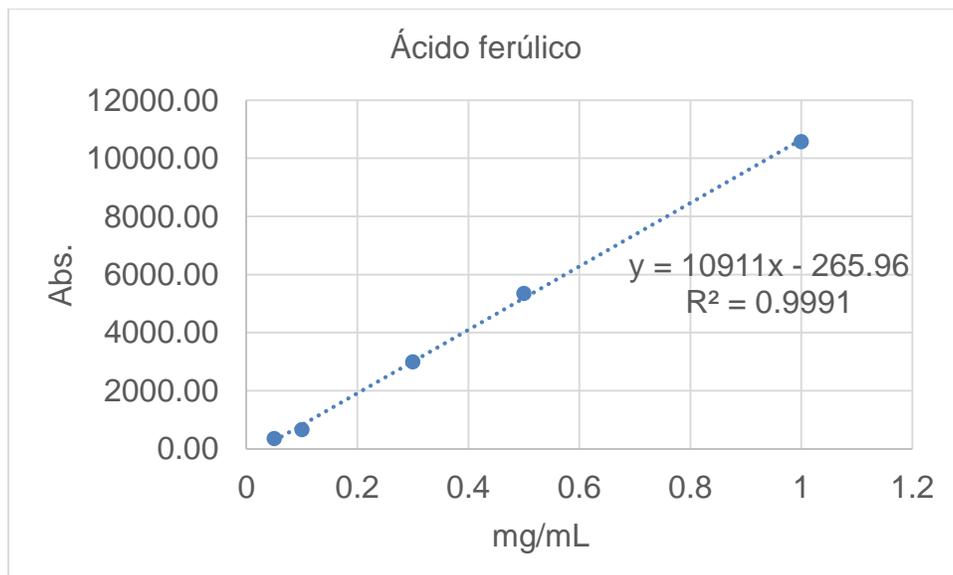


Figura 5. Curva de calibración de ácido gálico como estándar de referencia en la determinación de HPLC para ácidos fenólicos.

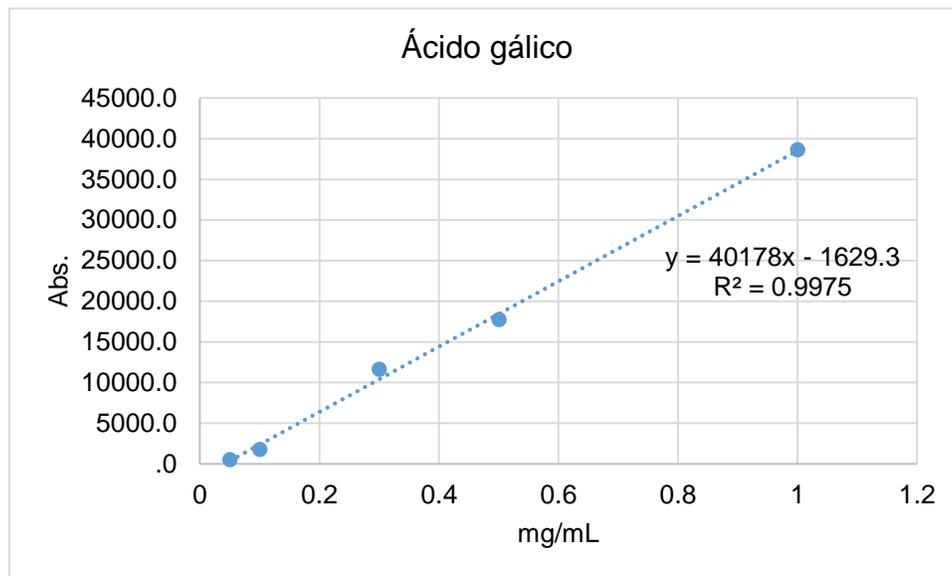


Figura 6. Curva de calibración de catequina como estándar de referencia en la determinación de HPLC para flavonoides.

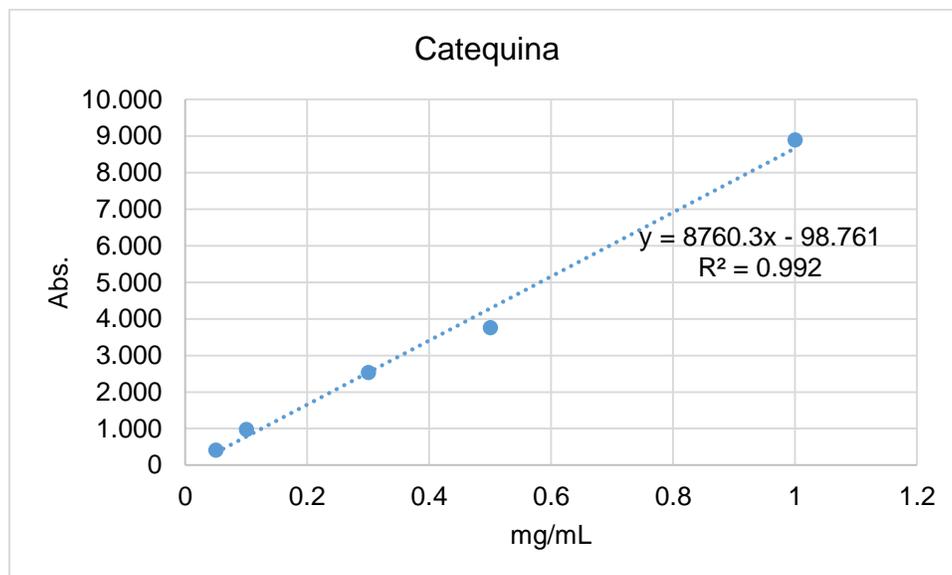


Figura 7. Curva de calibración de epicatequina como estándar de referencia en la determinación de HPLC para flavonoides.

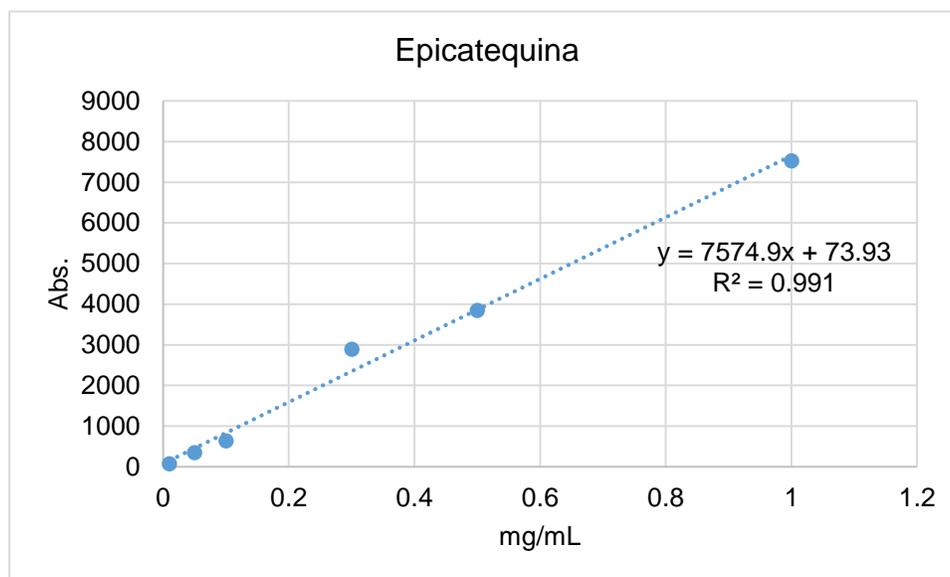


Figura 8. Curva de calibración de quercetina como estándar de referencia en la determinación de HPLC para flavonoides.

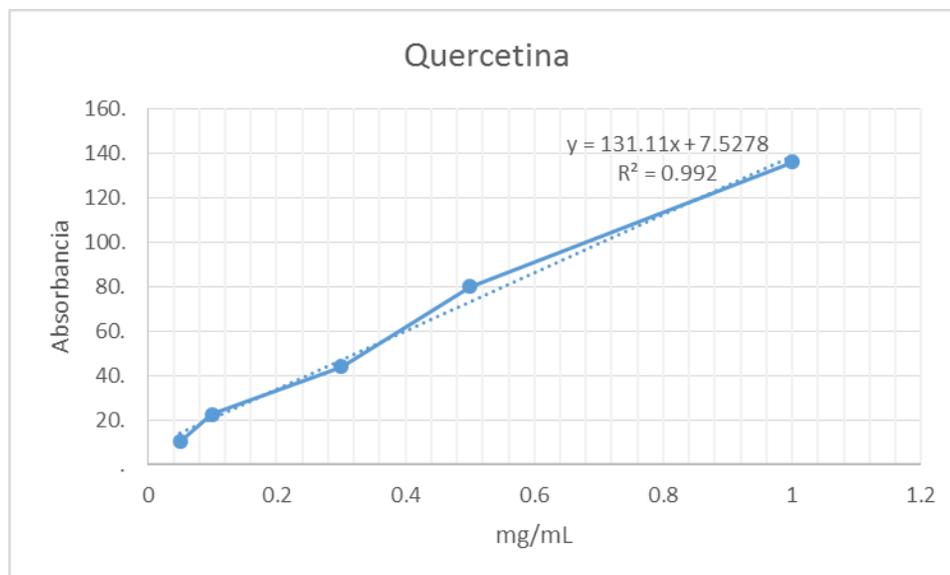


Figura 9. Curva de calibración de Trolox para el ensayo de capacidad de absorción de radical de oxígeno ORAC de los extractos de leche caprina.

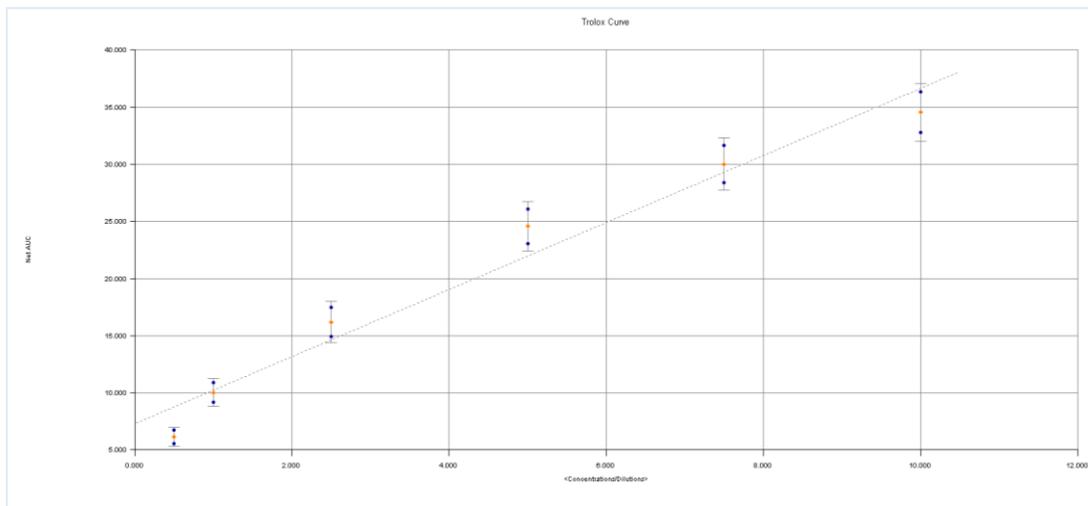


Figura 10. Pérdida de fluorescencia inducida por la adición de AAPH dependiente de la dosis de Trolox de los extractos de leche caprina.

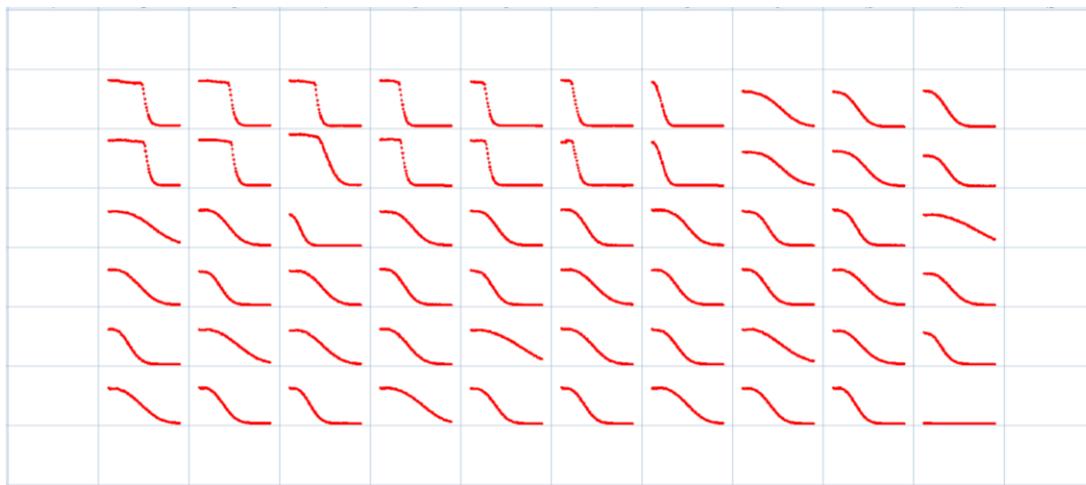
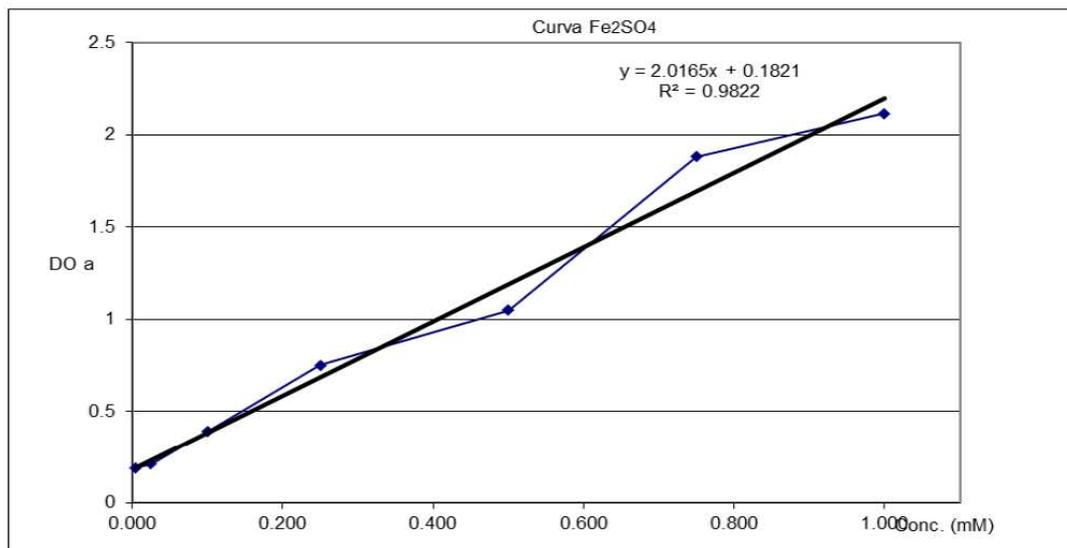
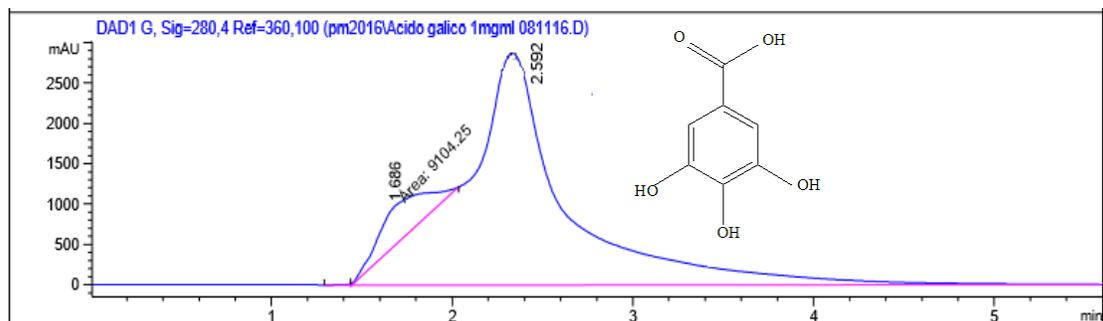


Figura 11. Curva de calibración de Fe_2SO_4 para el ensayo de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} de los extractos de leche caprina.



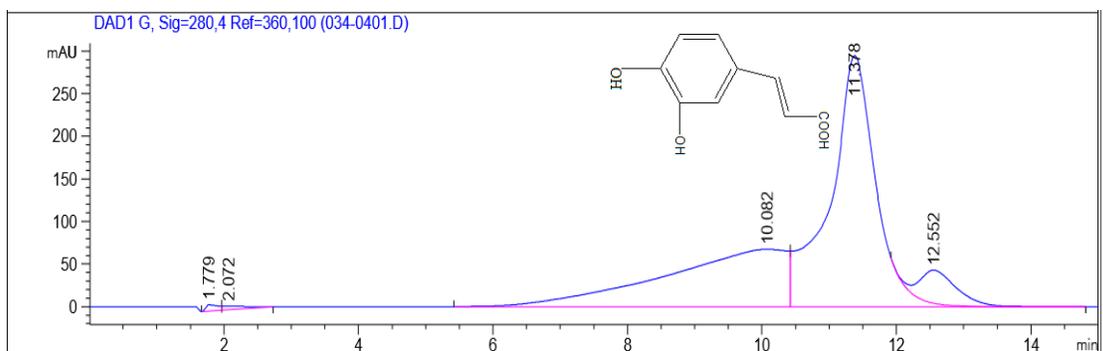
Anexo V. Cromatogramas

Figura 12. Cromatograma del estándar ácido gálico.



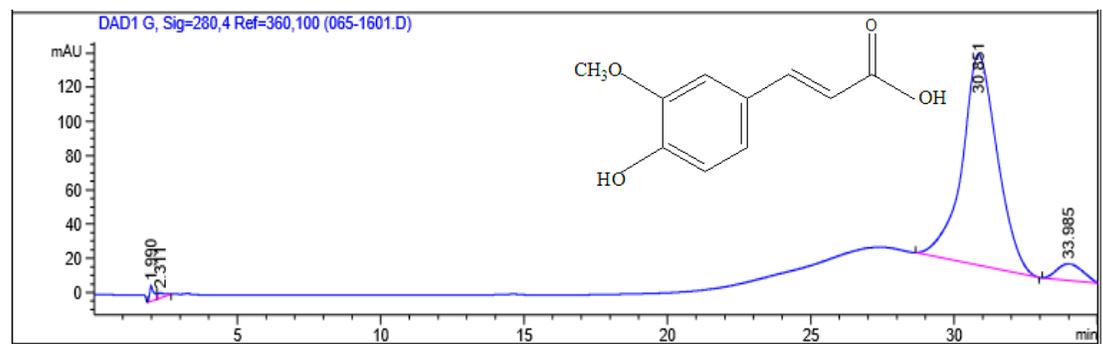
Se observa que el estándar aparece en 2.592 min.

Figura 13. Cromatograma del estándar ácido cafeico.



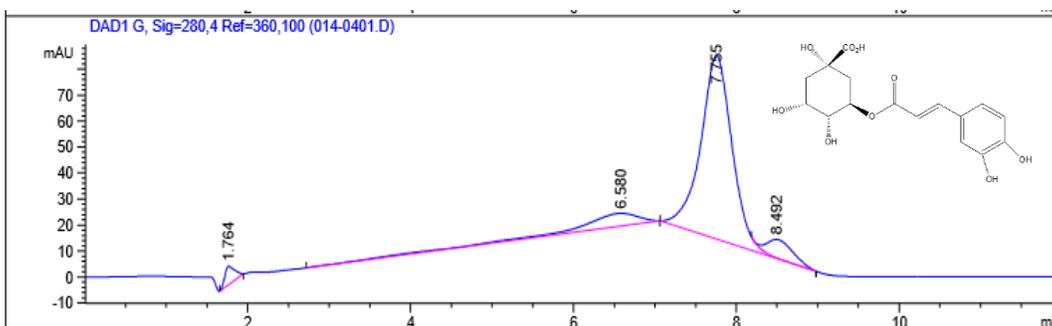
Se observa que el estándar aparece en 11.378 min.

Figura 14. Cromatograma para el estándar ácido ferúlico.



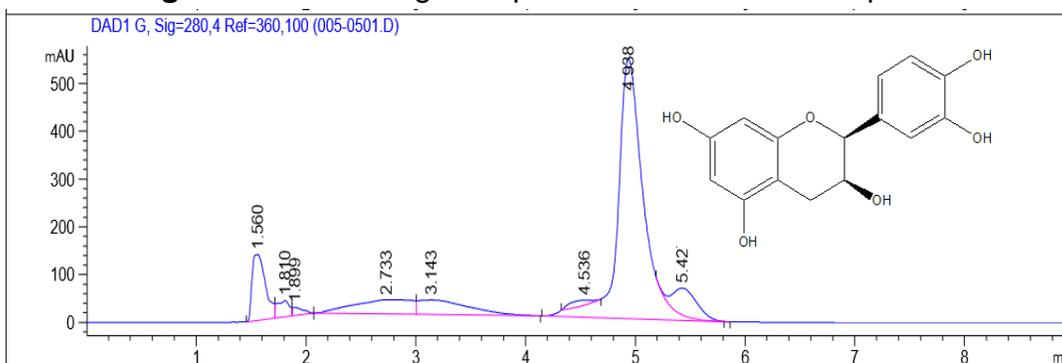
Se observa que el estándar aparece en 30.851 min.

Figura 15. Cromatograma para el estándar ácido clorogénico.



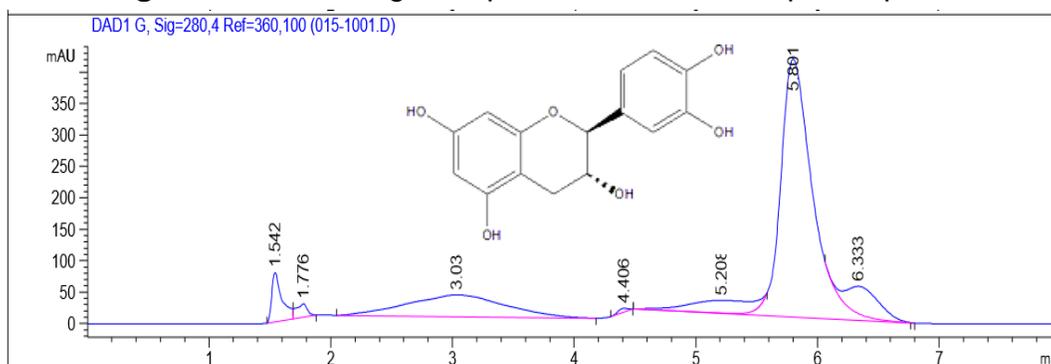
Se observa que el estándar aparece en 7.755 min.

Figura 16. Cromatograma para el estándar de catequina.



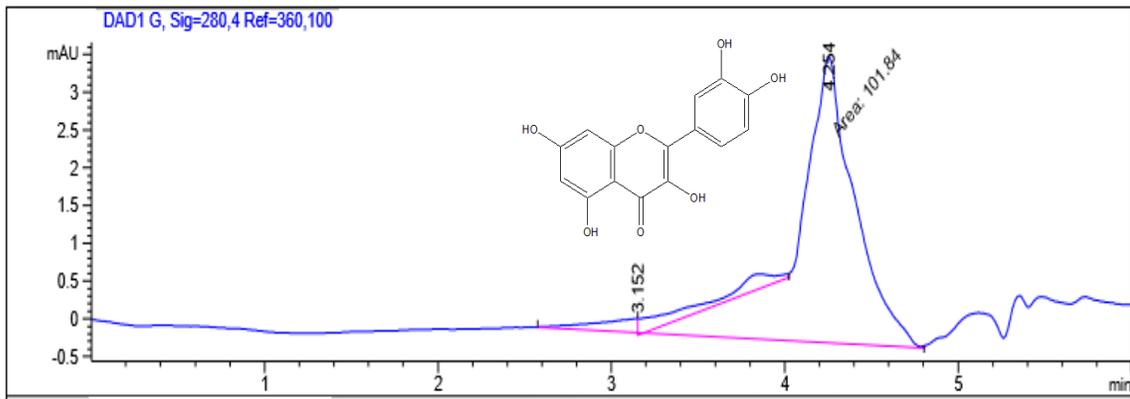
Se observa que el estándar aparece en 4.938 min.

Figura 17. Cromatograma para el estándar de epicatequina.



Se observa que el estándar aparece en 5.801 min.

Figura 18. Cromatograma para el estándar de quercetina.



Se observa que el estándar aparece en 4.254 min.

Figura 19. Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación en dieta base.

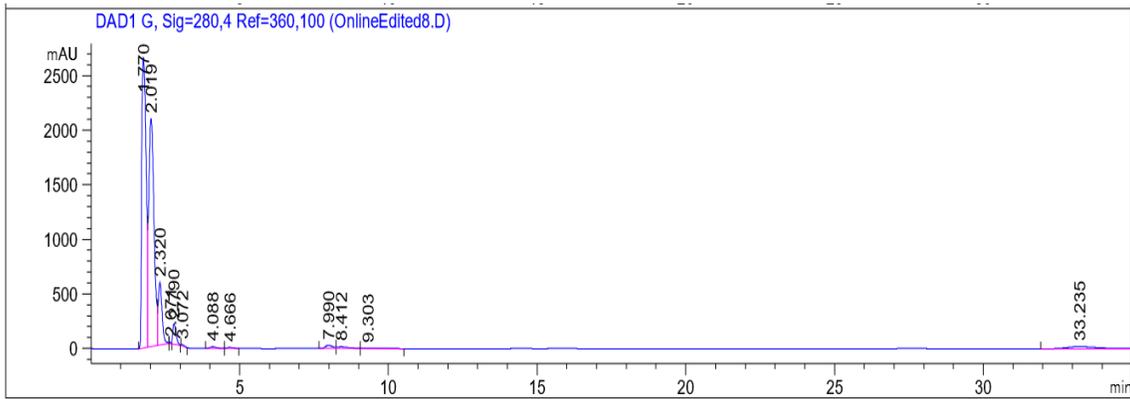


Figura 20. Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación en pastoreo.

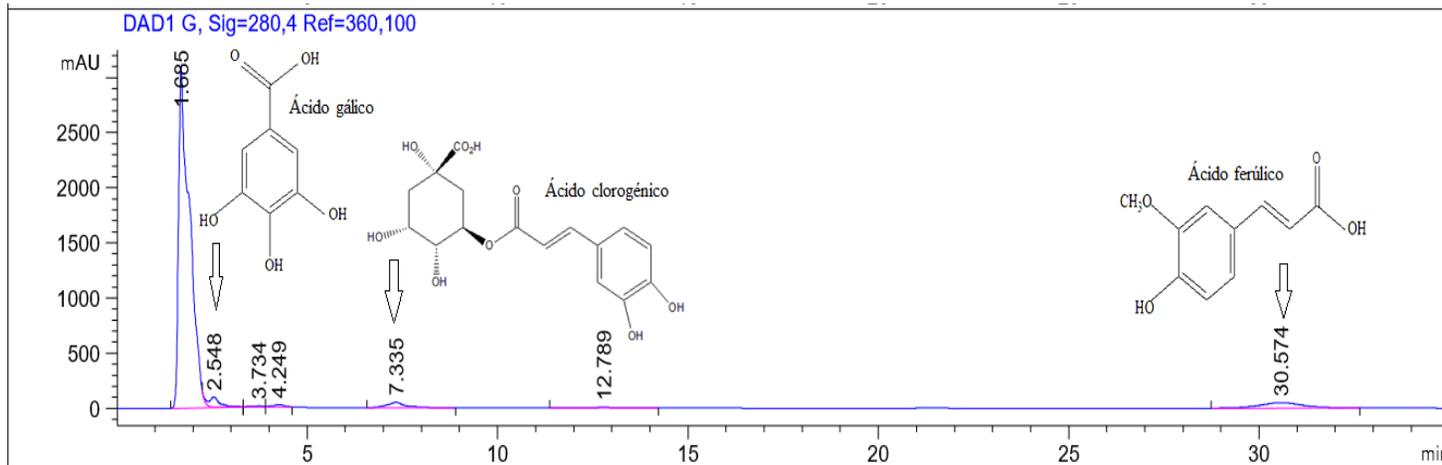


Figura 21. Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación DB + 10 % de los FAF.

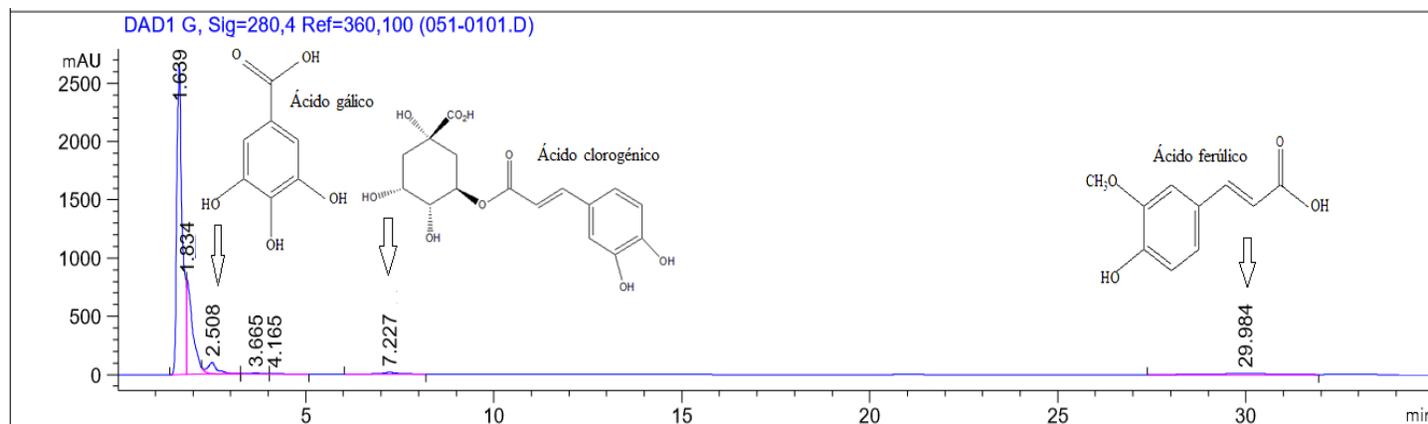


Figura 22. Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación DB + 20 % de los FAF.

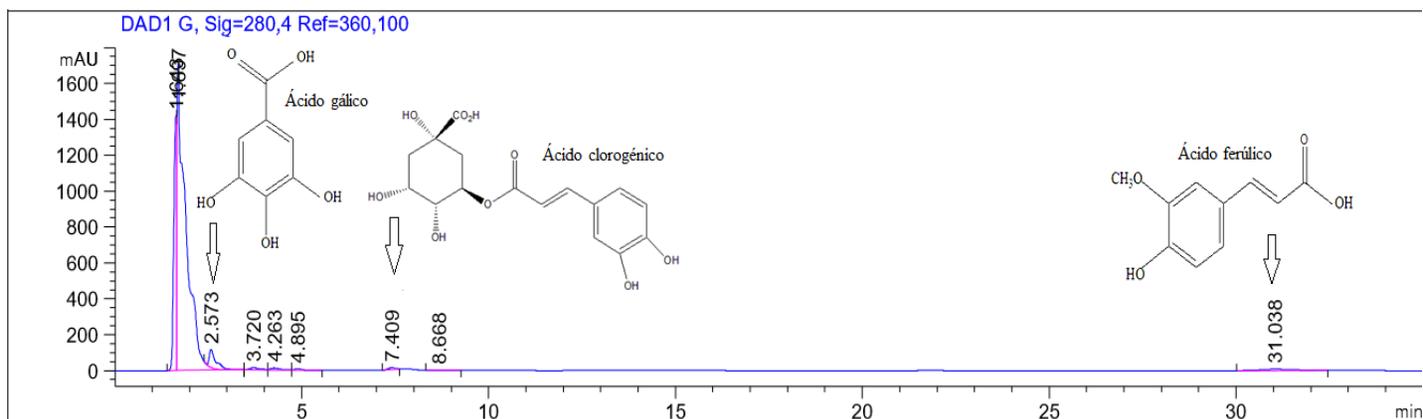


Figura 23. Cromatograma para ácidos fenólicos de extracto de la leche proveniente del sistema de alimentación DB + 30 % de los FAF.

