



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA.**

**COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE CORDEROS ALIMENTADOS
CON NIVELES CRECIENTES DE PULPA DE NARANJA Y EFECTO
ANTIOXIDANTE EN LA CARNE**

JUAN CARLOS TORRES RAMÍREZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

JULIO, 2017

La presente tesis, titulada: **Comportamiento productivo de corderos alimentados con niveles crecientes de pulpa de naranja y efecto antioxidante en la carne**, realizada por el alumno: **Juan Carlos Torres Ramírez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD
EN GANADERIA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



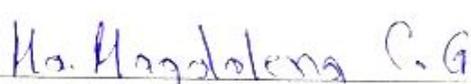
Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR



Dr. José Ricardo Barcena Gama

ASESORA



Dra. María Magdalena Crosby Galván

ASESOR



Dr. Nicolás Torres Salado

ASESOR



Dr. Benigno Ruíz Sesma

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2017.

COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE CORDEROS ALIMENTADOS CON NIVELES CRECIENTES DE PULPA DE NARANJA Y EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA CARNE

Juan Carlos Torres Ramírez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el nivel óptimo de inclusión de pulpa de naranja (PN) en dietas para corderos en un sistema *in vitro*, determinar la bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides totales en carneros, y evaluar el comportamiento productivo de corderos alimentados con contenidos crecientes de PN y efecto antioxidante en la carne. En el primer experimento se evaluaron los parámetros de fermentación *in vitro* con niveles crecientes de PN deshidratada (PND; 0, 5, 10, 15 y 20 %) en dietas para corderos, donde 0.5 g de cada dieta se incubaron durante 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h. La producción de gas se midió por desplazamiento de agua en cada horario indicado, al final de la incubación se registró el pH y se determinó la concentración de N-NH₃ y AGV; así mismo, se evaluó la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) en los horarios señalados, el diseño experimental fue completamente al azar. En el segundo experimento se midió la bioaccesibilidad de fenoles (FeT) y flavonoides (FIT) totales con el uso de cuatro carneros de la craza Suffolk x Dorset (45 ± 2 kg PV) cánulados en rumen y duodeno, distribuidos en un diseño cuadro latino 4x4, cuatro períodos de 15 d, 12 de adaptación a la dieta y 3 para la recolección de muestras con muestreos cada 4 h. Los carneros fueron suplementados con contenidos crecientes de PND en la dieta como tratamientos (T) (T1= 0, T2=17.5, T3=35 T4=52.5 %). Se recolectaron muestras de líquido ruminal y contenido duodenal 0, 4, 8, 12, y 24 h después de suministrar el alimento, las variables evaluados fueron degradación *in situ* de la MS (DISMS) y bioaccesibilidad de fenoles (FeT) y flavonoides (FIT) totales y pH. En el tercer experimento

se evaluó el comportamiento productivo de corderos alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja (PN) y su efecto en la oxidación de lípidos en la carne, con los tratamientos (T), T1=0, T2=13, T3=26 y T4=39 % PN respectivamente. Se evaluó la ganancia diaria de peso (GDP), consumo de MS (CMS), conversión alimenticia (CA) y la oxidación de lípidos en la carne durante la vida de anaquel. El diseño experimental fue completamente al azar y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey. Los resultados del primer experimento mostraron que a las 6 h de incubación, la producción de gas fue de 103.23^b, 103.69^b, 111.27^b, 113.63^b, 120.8^a mL y la DIVMS de 36.13^b, 37.03^b, 39.36^b, 40.80^b, 45.12^a% para los niveles de 0, 5, 10, 15, 20% de PND, respectivamente. No existió diferencia ($P>0.05$) en la concentración de AGV, pero el N-NH₃, se redujo ($P<0.05$) con 15 y 20% de PND. En el segundo experimento se determinó que la bioaccesibilidad de FeT fue mayor ($P<0.05$) en los carneros del T4 con respecto a los del grupo testigo y la bioaccesibilidad de FIT fue superior ($P<0.05$) para los tratamientos que incluyeron PND (T2, T3 y T4), sin diferencia entre estos. Los resultados del tercer experimento mostraron que la inclusión de contenidos crecientes de PN en la dieta no afectó ($P>0.05$) las variables productivas de los corderos; sin embargo, la oxidación de lípidos fue superior ($P<0.05$) en la carne de los corderos del T1 y T2, donde se incluyeron los contenidos más bajos de PN (0 y 13 % PN, respectivamente). La inclusión de 26 y 39 % de PN en la dieta (T3 y T4, respectivamente) retrasó la oxidación de lípidos en la carne de corderos durante la vida de anaquel evaluada.

Palabras clave: Pulpa de naranja, flavonoides, fenoles, bioaccesibilidad, borregos, efecto antioxidante.

LAMBS PERFORMANCE FED WITH INCREASING LEVELS OF ORANGE

PULP AND ANTIOXIDANT EFFECT ON MEAT

Juan Carlos Torres Ramírez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the optimal level of inclusion of orange pulp (OP) in lamb diets in an *in vitro* system, the bioaccessibility of phenols and total flavonoids in rams fed with different levels of OP, and the productive performance of lambs fed with increasing levels of OP and antioxidant effect on meat. In the first trial, the parameters of *in vitro* fermentation with increasing levels of dehydrated OP (0, 5, 10, 15 and 20 %) in lamb diets were evaluated using 0.5 g of each diet for incubated at 39 ° C for 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h. Gas production was measured by displacement of water at each indicated time, and at the end of the incubation pH, N-NH₃ and AGV concentration and *in vitro* dry matter degradability (IVDMD) were measured; the experimental design was completely randomized. In the second trial, bioaccessibility of total phenol (FeT) and flavonoids (FIT) were measured in four Suffolk x Dorset cross rams (45 ± 2 kg PV) provided with ruminal and duodenal cannula, Latin desing 4x4, four periods of 15 d, 12 d to diet adaptation and 3 d for samples collection with sampling at 4, 8, 12 and 24 h. Rams were supplemented with increasing levels of OP in the diet as treatments (T) (T1=0, T2=17.5, T3=35, and T4=52.5 %). Samples of ruminal fluid and duodenal content were collected in the established times and *in situ* DM digestibility (ISDMD), FeT and FIT bioaccessibility and pH was measured. In the third trial was evaluated the productive performance of lambs fed with increasing levels

of orange pulp (OP) and its effect on meat lipid oxidation, and the treatments (T) evaluated were T1= 0, T2= 13, T3= 26 and T4= 39% OP. Daily weight gain (DWG), DM consumption (DMC), feed conversion (FC), and meat lipid oxidation during shelf life were evaluated. A completely randomized design was used and treatments means were compared with Tukey test. In the first trial, at 6 hours of incubation, the gas production was 103.23^b, 103.69^b, 111.27^b, 113.63^b, 120.8^a mL and IVDMD of 36.13^b, 37.03^b, 39.36^b, 40.80^b, 45.12^a % for 0, 5, 10, 15, 20 % of OP, respectively. There was no difference (P> 0.05) in VFA concentration, but N-NH₃ levels were reduced (P<0.05) with 15 and 20 % of OP. In the second trial, the bioaccessibility of FeT was higher (P<0.05) in the rams of theT4 than in the control group and the bioaccessibility of FIT was higher (P <0.05) for treatments that included OP (T2, T3 and T4), without difference between these treatments. The inclusion of 20 and 52 % of DOP improved ruminal *in vitro* and *in situ* fermentation associated to the DM degradation. The inclusion of 52.5 % of OP apert the best concentration of total phenols and flavonoids in the duodenum to be bioaccessibles for antioxidant effect. The inclusion of 39 % OP in the diet of lambs does not affect animal production performance, and indicating the feasibility of replacing grains by OP; also FeT and FIT reduces meat lipid oxidation during shelf life.

Key words: Orange pulp, flavonoids, phenols, bioaccessibility, lambs, antioxidant effect, lipids oxidation.

AGRADACIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados por ser la institución que me brindo el espacio para realizar mis estudios.

Al Dr. David Hernández Sánchez por el apoyo para la realización y conclusión de mi tesis; por las recomendaciones y guía en mi formación profesional, pero sobre todo, por ser mi amigo y una persona de todo mi respeto y admiración.

A mi consejo particular, Dr. Ricardo Bárcena Gama, Dra. María Magdalena Crosby Galván, Dr. Nicolás Torres Salado, Dr. Benigno Ruíz Sesma. Por aceptar dirigir la tesis y guiarme académica y personalmente.

A la Ing. Elsa Margarita Crosby Galván, por ser un gran apoyo durante mi estancia en laboratorio.

A mis amigos Marco Antonio y Jeronimo por su apoyo y amistad durante la realización de mi postgrado.

DEDICATORIAS

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres

Mario Torres Velasco y Dolores Ramírez Martínez

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero sobre todo, por su amor.

A mis hermanos

Xiomara, Francisco, Luis, Adriana, Lesvi

Quienes han sido mis ángeles y nunca me han dejado solo y espero que la vida me conceda regresarle a esta hermosa familia un poco de lo mucho que me ha dado.

A mis sobrinos

Emmanuel, Valeria, Liliana, Anahí, Juan Diego, Juan Pablo, Edgardo, Mairim, Fernando y Mateo.

A quienes sin distinción les comento, que esto es una muestra de algo que se puede hacer en la vida, y que espero con gran ilusión que la mayoría de ustedes lleguen a graduarse de una carrera universitaria.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Literatura citada.....	3
CAPÍTULO I. CONTENIDOS CRECIENTES DE PULPA DE NARANJA EN LA DIETA Y SU EFECTO EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL <i>in vitro</i>	6
Abstract	7
Introducción	8
Materiales y métodos.....	9
Tratamientos y dietas experimentales	9
Incubaciones <i>in vitro</i>	10
Producción de gas y degradación <i>in vitro</i> de la materia seca	11
Variables de fermentación ruminal <i>in vitro</i>	12
Diseño experimental y análisis de los datos.....	13
Resultados y discusión.....	13
Producción de gas y degradación <i>in vitro</i> de materia seca.....	13
Variables ruminales.....	16
Conclusiones.....	18
Literatura citada.....	18

CAPÍTULO II. BIOACCESIBILIDAD DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES DE PULPA DE NARANJA EN CARNEROS	23
Resumen	23
Abstract	24
Introducción	25
Materiales y métodos.....	26
Localización.....	26
Determinación de hesperidina en la pulpa de naranja	28
Extracción de fenoles y flavonoides totales	28
Determinación de Fenoles totales.....	28
Determinación de flavonoides totales	28
Prueba metabólica	29
Caracterización química de las dietas	29
Degradación <i>in situ</i>	29
pH en líquido ruminal y duodenal	30
Fenoles y flavonoides en líquido ruminal y contenido duodenal.....	30
Análisis estadístico.....	30
Resultados y discusión.....	30
Degradación <i>in situ</i> de MS, FDN, FDA.....	30
Fenoles totales en líquido ruminal y duodenal.....	33

Flavonoides en líquido ruminal y duodenal	35
Bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides	38
Conclusiones.....	40
Literatura citada.....	40
CAPÍTULO III. RESPUESTA PRODUCTIVA DE CORDEROS ALIMENTADOS CON CONTENIDOS CRECIENTES DE PULPA DE NARANJA Y EFECTO ANTIOXIDANTE EN LA CARNE	49
RESUMEN	49
Introducción	50
Materiales y métodos.....	52
Localización.....	52
Animales	52
Variables productivas	53
Dietas y determinación de hesperidina.....	53
Caracterización química de las dietas	53
Extracción de fenoles y flavonoides totales	55
Determinación de Fenoles totales.....	55
Determinación de flavonoides totales	55
Oxidación de lípidos en carne.....	55
Análisis estadístico.....	56

Resultados y discusión	56
Variables productivas	56
Fenoles y flavonoides totales en carne	57
Oxidación de lípidos en carne	59
Conclusiones	62
Literatura citada	62
CONCLUSIONES GENERALES	69

LISTA DE CUADROS

Capítulo 1

Cuadro 1. Tratamientos experimentales y composición química de las dietas	9
Cuadro 2 Componentes de la solución mineral	11
Cuadro 3. Producción acumulada de gas <i>in vitro</i> (mL g ⁻¹ MS) de dietas con niveles crecientes de pulpa de naranja deshidratada.....	14
Cuadro 4. Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia seca de dietas elaboradas con niveles crecientes de pulpa de naranja deshidratada.....	15
Cuadro 6 . pH, Concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL ⁻¹) y de ácidos grasos volátiles en dietas elaboradas con niveles crecientes de pulpa de naranja deshidratada incubadas <i>in vitro</i>	16

Capítulo II

Cuadro 1. Composición química de las dietas experimentales y tratamientos evaluados....	27
Cuadro 2. Digestibilidad <i>in situ</i> de la MS, FDN, FDA de dietas elaboradas con niveles crecientes de pulpa de naranja	31
Cuadro 3. pH, en dietas elaboradas con niveles crecientes de pulpa de naranja incubadas <i>in situ</i>	33
Cuadro 4. Fenoles totales en líquido ruminal y duodenal (mg AG g ⁻¹) de carneros alimentados con diferentes niveles de pulpa de naranja	34
Cuadro 5. Flavonoides contenidos en líquido ruminal y duodenal (mg AG g ⁻¹) de carneros alimentados diferentes niveles de pulpa de naranja.....	36

Cuadro 6. Bioaccesibilidad de fenoles (mg AG g ⁻¹) y flavonoides (mg Hes g ⁻¹) totales en dietas y heces de carneros alimentados con diferentes niveles de pulpa de naranja	38
---	----

Capítulo III

Cuadro 1. Tratamientos evaluados y composición química de las dietas experimentales ...	54
Cuadro 2. Comportamiento productivo de corderos alimentados niveles crecientes de pulpa de naranja en la dieta	57
Cuadro 3. Fenoles y flavonoides totales en la carne de corderos alimentados con niveles crecientes de pulpa de naranja durante la vida de anaquel	58
Cuadro 4. Oxidación de lípidos en carne de corderos alimentados con niveles crecientes de pulpa de naranja durante la vida de anaquel.....	60

INTRODUCCIÓN GENERAL

La demanda de dietas saludables y seguras están en constante aumento, por ello diversas investigaciones en alimentos analizan sustancias de origen natural capaces de sustituir a los productos sintéticos utilizados para extender la vida útil de los alimentos (Gravador *et al.*, 2014). Los antioxidantes naturales en diversas formas se han utilizado para reducir o prevenir la oxidación de lípidos en los productos cárnicos, como son los extractos de plantas (Inserra *et al.*, 2014; Luciano *et al.*, 2017).

En este sentido, la pulpa de naranja, se puede emplear en la alimentación de rumiantes, especialmente en épocas críticas de producción de forraje (Gado *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2012). En México se transforman alrededor de 4, 200, 000 t de cítricos, de las cuales el 50% corresponden a la cáscara, bagazo y semillas (SAGARPA, 2017). Los residuos de naranja aportan sustratos energéticos debido al alto contenido de pectina (Lashkari y Taghizadeh, 2013; Shafiya *et al.*, 2016), y pueden estimular la fermentación ruminal, digestión de la fibra y síntesis de proteína microbiana (Piquer *et al.*, 2009; Gado *et al.*, 2011). Además, contribuye a reducir la contaminación ambiental producida por desechos industriales (López-Vigoa *et al.*, 2016; Zeki, 2016).

Los subproductos de la naranja representan una fuente importante de polifenoles (Lagha-Benamrouche y Madani, 2013), los cuales son considerados como nutraceuticos por su actividad antioxidante (Escobedo-Avellaneda *et al.*, 2014) al presentar uno o más grupos fenólicos en su estructura, actúan como metal-quelantes de radicales libres (Zong-Tsi *et al.*, 2012). Por lo anterior, la pulpa de naranja puede tener una aplicación valiosa en la alimentación de rumiantes como una alternativa nutraceutica (Luciano *et al.*, 2017).

En la literatura se ha documentado el uso de pulpa de naranja con el aumentó en la estabilidad oxidativa en la carne de corderos (Gravador *et al.*, 2014; Luciano *et al.*, 2017), por la actividad antioxidante de los polifenoles presentes; sin embargo, la oxidación lípidos es un proceso complejo y depende de la composición química de la carne, la luz, el acceso de oxígeno y la temperatura de almacenamiento (Inserra *et al.*, 2014). La carne y los productos cárnicos son ricos en proteínas y dependiendo del tipo de músculo, contienen cantidades y proporciones variables de triglicéridos y fosfolípidos (Guyon *et al.*, 2016; Ponnampalam *et al.*, 2017). La estabilidad de almacenamiento de la carne se puede ampliar con sistemas de envasado oportuno (Ponnampalam *et al.*, 2013), por la adición exógena de antioxidantes (Siripatrawan y Harte, 2010) o mediante la adopción de sistemas de alimentación capaces de mejorar el estado antioxidante del músculo (Inserra *et al.*, 2014; Luciano *et al.*, 2017). Con estos antecedentes, surge la necesidad de evaluar si la inclusión de pulpa de cítricos en la dieta de corderos incrementa la capacidad antioxidante y mejora las características físicoquímicas de la carne. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar el contenido óptimo de inclusión de pulpa de naranja en dietas para corderos en un sistema *in vitro*, determinar la bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides totales, y evaluar el comportamiento productivo de corderos alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja y efecto antioxidante en la carne.

Literatura citada

- Escobedo-Avellaneda, Z., Gutiérrez-Urbe, J., Valdez-Fragoso, A., Torres, J. A., Welti-Chanes, J. 2014. Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. *J. Funtional Foods*. 6:470-481.
- Gado H. M., Salem Z. M., Odongo N. E., Borhami B. E. 2011. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestión and growth performance in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol*. 165:131-136.
- Gravador, R. S., Jongberg, S., Andersen M. L., Luciano, G., Priolo, A., Lund M. N. 2014. Dietary citrus pulp improves protein stability in lamb meat stored under aerobic conditions. *Meat Sci*. 97:231-236.
- Guyon, C., Meynier, A., Lamballerie, M. 2016. Protein and lipid oxidation in meat: A review with emphasis on highpressure treatments. *Trends Food Science Technol*. 50:131-143.
- Hernández, J., Rojo, R., Salem, A. Z. M., Mirzaei, F., González, A., Vázquez, J. 2012. Influence different levels of dried citrus pulp on *in vitro* ruminal fermentation kinetics of total mixed ration in goat rumen inocula. *J. Anim. Feed Sci*. 21:458-467.
- Inserra, L., Priolo, A., Biondi, L., Lanza M., Bognanno M., Gravador, R., Luciano, G. 2014. Dietary citrus pulp reduces lipid oxidation in lamb meat. *Meat Sci*. 96:1489-1493.
- Lagha-Benamrouche, S., Madani, K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis L.* and *Citrus aurantium L.*) cultivated in Algeria:Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*. 50:723-730.
- Lashkari, S., Taghizadeh, A., 2015. Digestion kinetics of carbohydrate fractions of citrus by-products. *Veterinary Research Forum*. 6:41-48.

- López-Vigoa, O., Olivera-Castro, Y., Lamela-López, L., Sánchez-Santana, T., Montejó-Sierra, M., Rojo-Rubio, R. 2016. Influence of the complementation with sugarcane and/or citrus fruit pulp on the in vitro fermentation of diets based on *Megathyrus maximus* and *Leucaena leucocephala*. *Scientific Paper*. 39(4):253-262.
- Luciano, G., Roscini, V., Mattioli, S., Ruggeri, S., Gravador, R. S., Natalello, A., Lanza, M., de Angelis A., Priolo, A. 2017. Vitamin E is the major contributor to the antioxidant capacity in lambs fed whole dried citrus pulp. *Animal* 11:411-417.
- Piquer, O., Ródenas, L., Casado, C., Blas, E., Pascual, J. J. 2009. Whole citrus fruits as an alternative to wheat grain or citrus pulp in sheep diet: Effect on the evolution of ruminal parameters. *Small Rum. Res.* 83:14-21.
- Ponnampalam, E. N., Butler, K. L., Burnett, V. F., Jacobs, J. L., & Hopkins, D. L. 2013. Aged vacuum packaged lamb cuts are less brown than fresh muscle cuts under simulated retail display. *Food and Nutrition Sciences*. 4:147-153.
- Ponnampalam, E. N., Plozza, Tim., Kerr, M. G., Lindena, N., Mitchell, Meredith., Bekhit, A. E. D. A., Jacobs, J. L., Hopkins, D. L. 2017. Interaction of diet and long ageing period on lipid oxidation and colour stability of lamb meat. *Meat Sci.* 129:43-49.
- SAGARPA, 2017. http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/enero/Documents/JAC_0015-10.PDF. Consultado el 21 de junio de 2017.
- Shafiya, R., Rajkumari K., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., Ahmad G. N. 2016. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *J. Saudi Society Agric. Sci.* 24:1-8.
- Simitzis, P. E., Ilias-Dimopoulos, V., Charismiadou, M. A., Biniari, E. E., Deligeorgis, S. G. 2014. The effects of dietary hesperidin supplementation on lamb performance and meat characteristics. *J. Anim. Sci.* 84:136-143.

Siripatrawan, U., y Harte, B. R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. 24:770-775.

Zeky, B. 2016. Products of the citrus processing industry. Pp. 216-233.

Zong-Tsi, C., Heuy-Ling, C., Charng-Cherng, C., Chin-Chen, C., Pin-Der, D. 2012. Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. *Food Chemistry*. 135:2119-2127.

CAPÍTULO I. CONTENIDOS CRECIENTES DE PULPA DE NARANJA EN LA DIETA Y SU EFECTO EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro*

Juan C. Torres-Ramirez¹; David Hernández-Sánchez^{1*}; José R. Bárcena-Gama¹; María M. Crosby-Galván¹; Nicolás Torres-Salado²; Benigno Ruiz-Sesma³

¹Posgrado de Ganadería, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Campus Motecillo, km 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Municipio de Texcoco, Edo. de México. sanchezd@colpos.mx*; ²Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero; ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas.

Resumen

Agregar subproductos de naranja en dietas para rumiantes representa una alternativa ante el alto costo y disponibilidad de los granos. El estudio tuvo como objetivo determinar los parámetros de fermentación *in vitro* con contenidos crecientes de pulpa de naranja deshidratada (PND; 0, 5, 10, 15 y 20 %) en dietas para corderos. Para ello, se desarrolló una prueba de degradación *in vitro* en donde 0.5 g de cada dieta se incubaron a 39°C durante 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h. La producción de gas se midió por desplazamiento de agua en cada horario indicado, al final de la incubación se registró el pH y se tomó 0.80 mL del cultivo para determinar la concentración de N-NH₃ y AGV; así mismo, se determinó la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) en los horarios señalados. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento, y la prueba de Tukey se utilizó para la comparación de medias. A las 6 h de incubación, la producción de gas fue de 103.23^b,

103.69^b, 111.27^b, 113.63^b, 120.8^a mL y la DIVMS de 36.13^b, 37.03^b, 39.36^b, 40.80^b, 45.12^a % para los contenidos de 0, 5, 10, 15, 20% de PND, respectivamente. No existió diferencia ($P > 0.05$) en la concentración de AGV, pero el N-NH₃, se redujo ($P < 0.05$) con 15 y 20 % de PND. La inclusión de 20 % de PND propició las mejores condiciones de fermentación ruminal *in vitro* asociándose a una degradación de MS.

Palabras clave: Degradación *in vitro*, producción de gas, pulpa de naranja, fermentación.

Abstract

Adding orange by-products in diets for ruminants represents an alternative to the high cost and availability of grains. The objective of this study was to determine the parameters of *in vitro* fermentation with increasing levels of dehydrated orange pulp (PND, 0, 5, 10, 15 and 20 %) in diets for growing lambs. An *in vitro* degradability test was developed with 0.5 g of each diet incubated at 39 ° C for 0, 6, 12, 24, and 48 h. Gas production was measured by water displacement, and at the end of the incubation the pH was measured, and 0.80 mL of the culture was taken to determine the concentration of N-NH₃ and AGV; additionally, *in vitro* dry matter degradability (IVDMD) was determined at the indicated times. The experimental design was completely randomized and Tukey's test was used for means comparison. At 6 hours of incubation the gas production was 103.23^b, 103.69^b, 111.27^b, 113.63^b, 120.8^a mL and IVDMD of 36.13^b, 37.03^b, 39.36^b, 40.80^b, 45.12^a % for the levels of 0, 5, 10, 15, 20 % of PND, respectively. It is concluded that the inclusion of 20 % of PND modifies the ruminal variables, reducing N-NH₃ concentrations, and improved IVDMD.

Key words: *in vitro* degradability, gas production, orange pulp, fermentation.

Introducción

En México se transforman alrededor de 4, 200, 000 t de cítricos, de las cuales 50 % corresponden a la cáscara, bagazo y semillas (SAGARPA, 2017). Estos subproductos se pueden emplear en la alimentación de rumiantes, especialmente cuando la producción de forrajes es crítica (Gado *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2012); además, contribuye a disminuir la contaminación ambiental producida por desechos industriales (López-Vigoa *et al.*, 2016; Zeki, 2016) y reducen el uso de cereales, los cuales constituyen el ingrediente principal y más costoso en la dieta de rumiantes en sistemas intensivos (Olivera *et al.*, 2017).

Los residuos de naranja aportan sustratos energéticos debido al alto contenido de pectina (Lashkari y Taghizadeh, 2013; Shafiya *et al.*, 2016), y pueden estimular la fermentación ruminal, la digestión de la fibra (Gado *et al.*, 2011), existiendo mayor producción de ácidos grasos volátiles y disponibilidad de amonio para la síntesis de proteína microbiana (Piquer *et al.*, 2009); sin embargo, los informes relacionados con la producción de gas al usar pulpa de cítricos no son consistentes, observándose incremento (López-Vigoa *et al.*, 2016) o reducción en esta variable (Seradj *et al.*, 2014).

Los flavonoides presentes en subproductos de cítricos contribuyen a la fermentación ruminal, estabilizan el pH al incrementar las bacterias utilizadoras de lactato (Balcells *et al.*, 2012), y pueden reducir la producción de gas (Seradj *et al.*, 2014) por una posible disminución de bacterias metanogénicas. No obstante, no se conoce el contenido de inclusión apropiado de subproductos de cítricos en la dieta de rumiantes, capaz de optimizar la fermentación ruminal y reducir la producción de gas. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar la inclusión de contenido crecientes de pulpa de naranja en la dieta y su efecto en la fermentación ruminal *in vitro*.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal perteneciente al Posgrado de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Montecillo, Estado de México.

Tratamientos y dietas experimentales

Se realizó una prueba de degradación *in vitro* con la inclusión de 0, 5, 10, 15 y 20 % de pulpa de naranja deshidratada (PND) en dietas para corderos en crecimiento como tratamientos (Cuadro 1), elaboradas con base en los requerimientos establecidos por el NRC (2007).

Cuadro 1. Tratamientos experimentales y composición química de las dietas

	Tratamientos (T)				
	T1	T2	T3	T4	T5
Ingredientes, %					
Pulpa de naranja deshidratada	0	5	10	15	20
Maíz quebrado	65	60	55	50	48
Pasta de soya	10	10	10	10	10
Melaza	5	5	5	5	5
Paja de avena	18	18	18	18	15
Premezcla mineral	2	2	2	2	2
Composición química ⁻¹					
EM, Mcal kg ⁻¹	2.84	2.83	2.81	2.80	2.83
PC, %	13.27	13.25	13.23	13.21	13.19

EE, %	3.2	3.18	3.16	3.14	3.18
CEN, %	5.74	6.00	6.25	6.51	6.58
FDN, %	21.9	22.51	23.12	23.73	22.43

¹MS: materia seca, todos los demás valores están en base materia seca. PC = proteína cruda;

CEN: cenizas; EE = extracto etéreo; FDN: fibra detergente neutro.

Incubaciones *in vitro*

Se realizaron cinco series de incubación en diferentes días y cada tratamiento tuvo cinco repeticiones en cada horario de muestreo (0, 6, 12, 24, 48 y 72 h). Dos toros Holstein (750 ± 40 kg PV) fistulados en rumen y alimentados con una dieta a base de forraje y concentrado (20:80), se utilizaron como donadores de líquido ruminal, y fueron manejados de acuerdo al Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados (CP, 2016). El fluido ruminal se recolectó 2 h antes de la alimentación matutina, en cuatro puntos en la región rumen-retículo y se filtró a través de cuatro capas de manta de cielo; se combinaron cantidades iguales de fluido ruminal de cada toro y la mezcla se mantuvo a 39 °C en condiciones anaeróbicas durante el transporte al laboratorio. El experimento se llevó a cabo en viales de vidrio color ámbar de 120 mL con el sustrato de cada tratamiento (0.5 g por vial; Cuadro 1), a los que se añadieron 60 mL de inóculo elaborado a base de una mezcla de fluido ruminal y solución mineral (Menke y Steingass, 1988; Cuadro 2) en una proporción 1:2 v/v, respectivamente. Se incluyeron tres frascos como blancos, que sólo contenían el inóculo. Los viales se mantuvieron con flujo de CO₂ durante la inoculación, se taparon y después se colocaron en una incubadora a 39 °C (Ramirez-Bribiesca *et al.*, 2011).

Producción de gas y degradación *in vitro* de la materia seca

Se usó la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1994) para evaluar la fermentación. Se midió la presión de gas en cada vial se midió a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación, mediante un manómetro manual (INFRA Metron[®], Modelo 63100, Finesa, México) con escala de 0 a 1 kg cm⁻². Las lecturas de presión (kg cm⁻²) se transformaron a volumen de gas con la ecuación de regresión lineal $V = (P + 0.0145) (0.018)^{-1}$ (Orskov y Mc Donald, 1979). Los datos de volumen de gas y tiempo de incubación se usaron para obtener el volumen fraccional (Vf). Las variables de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido (Vmax), fase de retardo (L) y tasa de producción de gas (S), se obtuvieron mediante un modelo logístico (Pitt *et al.*, 1999).

Cuadro 2 Componentes de la solución mineral

Solución buffer	
Agua destilada, mL	932.02
Bicarbonato de amonio, g	3.7280
Bicarbonato de sodio, g	32.620
Solución macromineral	
Agua destilada, mL	932.02
Fosfato de sodio dibásico, g	5.3124
Fosfato de potasio monobásico, g	5.7784
Sulfato de magnesio heptahidratado, g	0.5592
Solución micromineral	
Agua destilada para 100, mL	
Cloruro de calcio dihidratado, g	13.2

Cloruro de magnesio tetrahidratado, g	10
Cloruro de cobalto hexahidratado, g	1
Cloruro férrico, g	8
<hr/>	
Indicador de óxido-reducción	
<hr/>	
Resarzurina al 1%, mL	4.80
<hr/>	
Solución reductora	
<hr/>	
Agua destilada, mL	186.6
Sulfato de sodio anhidros, g	1.064
Sosa 0.1 N, mL	7.466
<hr/>	
Líquido ruminal	
<hr/>	
Líquido ruminal, mL	1666.66
Agua destilada, mL	1664.31
<hr/>	
Menke y Steingass, 1988.	

Al final de la incubación, los viales se retiraron de la incubadora y el cultivo se filtró a través de papel Whatman 541 (ϕ poro 10 μ m), las muestras residuales se secaron a 60 °C por 24 h, se pesaron para calcular la MS residual y calcular la degradación *in vitro* de la MS (DIVMS).

Variables de fermentación ruminal *in vitro*

Al concluir la incubación se midió el pH en el medio de cultivo de cada vial con un potenciómetro (ORION® model 250A, Thermo Scientific, USA), posteriormente del fluido filtrado se mezclaron muestras (1 mL) con 0.2 mL de ácido metafosfórico al 25% (p/v) y se almacenaron a 4 °C. El nitrógeno amoniacal (N-NH₃) se midió por la técnica de fenol-hipoclorito (McCullough, 1967) usando un Espectrofotómetro (CARY® 1-E Varian, USA) y la concentración de ácidos graso volátiles (AGV) (Erwin *et al.*, 1961) fue medida en un

cromatógrafo de gases (Hewlett packard, model 6890, USA) con detector FID, automuestreador 738376, la columna capilar HP-FFAP longitud 30 m, diámetro interno 0.25 mm y película de 0.25 micras. Temperatura del inyector 230°C, detector 240° C con un flujo de hidrógeno de 33 mL min⁻¹ y flujo de aire de 330 mL min⁻¹ y como gas acarreador nitrógeno a 0.8 mL min⁻¹ y el horno con una rampa de temperatura inicial de 65°C (1 min) a 95°C (durante 0.15 min) a 65°C min⁻¹ y posteriormente un incremento a 145°C (durante 6 min) a una velocidad de 15°C min⁻¹ con un Split de 10, originando una corrida de 5.5 minutos.

Diseño experimental y análisis de los datos

El diseño experimental fue completamente al azar y los datos de producción de gas y degradación *in vitro* de la MS (DIVMS) se analizaron con medidas repetidas en el tiempo, mediante PROC MIXED (SAS, 2013). Las variables pH, nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y ácidos grasos volátiles (AGV) fueron analizados con PROC GLM (SAS, 2013) y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey.

Resultados y discusión

Producción de gas y degradación *in vitro* de materia seca

La producción de gas (PG) *in vitro* (Cuadro 3) fue superior (P<0.05) a las 6, 48 y 72 h de incubación al incluir 20 % de pulpa de naranja deshidratada (PND) en la dieta (T5). Así mismo, la inclusión del contenido más alto de PND (20 %; T5) en la dieta se relacionó con la máxima (P<0.05) degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) (Cuadro 4) a las 6 h de incubación. Se ha documentado que la degradación microbiana de la dieta depende de interacciones con otros nutrientes, principalmente compuestos energéticos y proteínicos que estimulen el crecimiento y actividad de la flora ruminal (Piquer *et al.*, 2009); en este sentido,

la DIVMS y la PG observada en el T5 se explica por el contenido de carbohidratos fermentables aportados con 20 % de PND en la dieta y se relacionó con mayor suministro de azúcares y pectinas presentes en los residuos de naranja (Lashkari y Taghizadeh, 2013; Shafiya *et al.*, 2016), los cuales estimulan la fermentación ruminal, la digestión (Gado *et al.*, 2011), e incrementan la síntesis de proteína microbiana (Piquer *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Producción acumulada de gas *in vitro* (mL g⁻¹ MS) de dietas con contenidos crecientes de pulpa de naranja deshidratada

Tratamientos (T)	Horarios de incubación					
	Nivel de PND, %	0	6	12	24	48
T1= 0	63.01 ^b	124.71 ^b	175.27	287.42	348.82 ^b	347.81 ^b
T2= 5	64.26 ^b	113.72 ^b	185.23	293.55	351.81 ^b	357.19 ^b
T3= 10	71.73 ^b	122.24 ^b	185.76	291.40	350.85 ^b	356.34 ^b
T4= 15	71.86 ^b	122.72 ^b	186.39	298.65	352.52 ^b	357.01 ^b
T5= 20	78.14 ^a	131.90 ^a	197.43	303.83	364.77 ^a	367.75 ^a
EEM*	5.69	5.69	5.69	5.69	5.69	5.69

PND= Pulpa de naranja deshidratada; EEM*= Error estándar de la media; ^{a, b} Valores con distinta literal en columna indican diferencias (P<0.05).

Los resultados de este estudio son congruentes con los reportados en la literatura en los cuales se recomienda sustituir los granos por PND en dietas para rumiantes (Gado *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2012); sin embargo, la respuesta está en función del contenido de inclusión,

observándose mejoras en la degradación con 40 % de PND, al sustituir almidón por pectina contenida en la pulpa de cítricos; aunque al incluir 65 % de PND en la dieta causa trastornos metabólicos (Bueno *et al.*, 2002); no obstante, los resultados de este estudio presentaron mejoras en la DIVMS con 20 % de PND.

Cuadro 4. Degradación *in vitro* de la materia seca de dietas elaboradas con contenidos crecientes de pulpa de naranja deshidratada

Tratamientos (T)	Horarios de incubación			
Nivel de PND, %	6	12	24	48
T1= 0	36.13 ^b	50.04	61.99	77.72
T2= 5	37.03 ^b	52.19	65.22	79.12
T3= 10	39.36 ^b	51.30	60.53	78.95
T4= 15	40.80 ^b	50.19	63.83	78.38
T5= 20	45.12 ^a	47.97	66.92	81.81
EEM*	1.86	1.86	1.86	1.86

PND= Pulpa de naranja deshidratada; EEM*= Error estándar de la media; ^{a, b} Valores con distinta literal indican diferencias (P<0.05).

El incremento en la PG al incluir 20 % de PND en la dita se relacionó con la degradación y estuvo en función de la disponibilidad energética de los componentes de la dieta (Van Dung *et al.*, 2014), donde la pectina tuvo efecto primordial (Shafiya *et al.*, 2016). Congruente con lo anterior, López-Vigoa *et al.* (2016) relacionaron el aumento en la PG con la degradación de la MS al incluir 10 y 20 % de PND en la dieta, como ocurrió en este estudio en el T5. Adicionalmente, se ha relacionado el aumento en la producción de gas con mayor degradación de la FDN, cuando se incrementa la PND en la dieta (Soltan *et al.*, 2012;

Hernández *et al.*, 2012; Lashkari y Taghizadeh, 2013) y se explica por los componentes de la fracción de FDN que incluye pectina (250 g kg⁻¹), azúcares solubles (120 a 400 g kg⁻¹), además de residuos de almidón en la PND (10 g kg⁻¹) (Volanis *et al.*, 2004), haciendo de esta un producto altamente fermentable cuando se incluyen contenidos considerables de PND en la dieta (Gado *et al.*, 2011) como ocurrió en el T5.

Variables ruminales

El Cuadro 5 presenta los resultados de las variables ruminales evaluadas. La concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) disminuyó (P<0.05) con 15 y 20 % de PND en la dieta.

Cuadro 5 . pH, Concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL⁻¹) y de ácidos grasos volátiles en dietas elaboradas con contenidos crecientes de pulpa de naranja deshidratada incubadas *in vitro*

Variables	Niveles de pulpa de naranja deshidratada, %					EEM*
	0	5	10	15	20	
pH	6.61	6.60	6.62	6.64	6.60	0.019
N-NH ₃	61.3 ^a	60.64 ^a	61.96 ^a	54.16 ^b	51.81 ^b	1.34
Acético	62.4	63.38	62.92	61.29	63.60	2.164
Propiónico	17.3	17.35	17.68	19.11	18.63	1.221
Butírico	16.73	16.79	16.70	15.58	15.86	0.681
Isobutírico	1.85	1.82	1.81	1.74	1.80	0.121
Isovalérico	2.11	2.06	2.06	1.90	2.01	0.110
Ac:P	3.27	3.40	3.37	3.50	3.59	0.018

N-NH₃ = Nitrógeno amoniacal; EEM*= Error estándar de la media; ^{a, b}. Valores con distinta

literal en hilera indican diferencias, (P<0.05).

No existieron diferencias ($P>0.05$) en los valores de pH y ácidos grasos volátiles (AGV) entre los tratamientos evaluados. La disminución de 15.48 N-NH₃ observada en este estudio coincide con lo reportado por Gado *et al.* (2011) quienes observaron una disminución de 11 % en la concentración de este metabolito cuando incluyeron ensilado de pulpa de naranja (15 %) en la dieta y se explica por un incremento en el consumo de N-NH₃ por las bacterias ruminales (Kholif *et al.*, 2014; Seradj *et al.*, 2014) cuando estas disponen de fuentes carbonadas disponibles en la PND (Piquer *et al.*, 2009; Lashkari y Taghizadeh, 2013). Lo anterior propicia incremento en la síntesis de aminoácidos y mayor crecimiento microbiano, relacionándose con un aumento de la fermentación (López *et al.*, 2014; Berumen *et al.*, 2015), como ocurrió en este estudio (Cuadro 4) al incluir 20 % de PND en la dieta.

Dietas concentradas como la evaluada en esta investigación suelen afectar el pH ruminal en un sistema *in vivo*; sin embargo, en un sistema *in vitro*, los componentes del medio de cultivo amortiguan los cambios de pH y favorecen la viabilidad de las bacterias ruminales (Vallejo, 2014). A pesar de haberse detectados cambios en la DIVMS con el nivel más alto de PND, la concentración de AGV no fue afectada. De manera similar, en un estudio *in vitro* donde se evaluó la inclusión de extractos de flavonoides de cítricos no reportaron cambios en las concentraciones de AGV y pH manteniéndose en 6.7 (Seradj *et al.*, 2014), similares a los datos encontrados en el presente estudio. No obstante, con contenidos de 13, 15, 26 y 33 % PND en la dieta e incubaciones *in vivo* se reportó una disminución en el pH de 6.3 después de la alimentación, relacionándose con la fermentación rápida de azúcares y pectinas (Piquer *et al.*, 2009; Gado *et al.*, 2011).

Conclusiones

La inclusión de 20 % de pulpa de naranja deshidratada mejora la degradación ruminal *in vitro* de la materia seca y redujo la concentración de nitrógeno amoniacal, sin afectar el pH y la concentración de AGV. Se sugiere sustituir 20 % de PND en la dieta de rumiantes para evaluaciones posteriores *in vivo*.

Literatura citada

- Balcells, J. Aris, A., Serrano, A., Seradj A, R., Crespo, J., Devant, M., 2012. Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 90:4975-4984.
- Berumen, Leslie., Páez, J., Soto, N. O., Murillo, M., Herrera, Esperanza & Muro, A. 2015. Chemical composition, *in vitro* gas production and energetic value of prickly pear fermented with and without *Kluyveromyces marxianus*. *J. Bio Sci. Biotechnol.* 4 (3):359-364.
- Bueno, M, S., Ferrari, E., Blanchini, D., Leinz, F, C., & Rodríguez, F. 2002. Effect of replacing corn with dehydrated citrus pulp in diets of growing kids. *Small Rum. Res.* 46:179-185.
- CP. 2016. Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. Consejo general académico. ACUERDO 02.11.16.
- Erwin, E, S., Marco, G, J., and Emery, E. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768-1771.

- Gado, H. M., Salem, A. Z. M., Odongo N. E., Borhami, B. E. 2011. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165:131-136.
- Hernández, J., Rojo, R., Salem, A. Z. M., Mirzaei, F., González, A., Vázquez, J. 2012. Influence different levels of dried citrus pulp on in vitro ruminal fermentation kinetics of total mixed ration in goat rumen inocula. *J. Anim. Feed Sci.* 21:458-467.
- Kholif, A. E., Khattab, H. M., ElShewy, A. A., Salem A. Z. M., Kholif, A. M., ElSayed, M. M., Gado, H. M., Mariezcurrena, M. D. 2014. Nutrient digestibility, ruminal fermentation activities, serum parameters and milk production and composition of lactating goats fed diets containing rice straw treated with *Pleurotus ostreatus*. *Asian Australasian J. Anim. Sci.* 27:357-364.
- Lashkari, S. & Taghizadeh, A. 2013. Nutrient digestibility and evaluation of protein and carbohydrate fractionation of citrus by products. *J. Anim. Phys. Anim. Nut.* 97 (4):701-709.
- López, O., Olivera, Y., Lamela, L., Sánchez, T., Montejo, I. L., Ronquillo, M. 2014. Efecto de la suplementación con concentrado en la fermentación *in vitro* de dietas para vacas lecheras en silvopastoreo. *Pastos y Forrajes.* 37 (4):426-434.
- López-Vigoa, O., Olivera-Castro, Y., Lamela-López, L., Sánchez-Santana, T., Montejo-Sierra, M. G. R and Rojo-Rubio, R. 2016. Influence of the complementation with sugarcane and/or citrus fruit pulp on the in vitro fermentation of diets based on *Megathyrus maximus* and *Leucaena leucocephala*. *Scientific Paper.* 39(4):253-262.

- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem.* 17:297-302.
- Menke, K.H., Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:7-55.
- NRC. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants. Sheep, goats, cervids, and new world camelids. 1st Ed. Nat. Ac. Press, Washington, D.C.
- Oliveira, A. M., Alves, P. S., Santos-Silva, J., Bessa, J. B. R. 2017. Effect of dietary starch level and its rumen degradability on lamb meat fatty acid composition. *Meat Sci.* 123:166-172.
- Ørskov, E. R and McDonald, L. M. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*. 92: 499-503.
- Piquer, O., Ródenas, L., Casado, C., Blas, E., Pascual, J, J. 2009. Whole citrus fruits as an alternative to wheat grain or citrus pulp in sheep diet: Effect on the evolution of ruminal parameters. *Small Rumin. Res.* 83:14-21.
- Pitt, R. E., Cross, T. L., Pell, A. N., Shofield, P and Doane. P. H. 1999. Use of in vitro gas production models in ruminal kinetics. *Math. Biosci.* 159: 145-163.
- Ramirez-Bribiesca, J. E., Wang, Y., Jin, L., Canam, T., Thown, A. T, J. R., Dumonceaux, T. J and McAllister, T. A. 2011. Chemical characterization and in vitro fermentation of

- Brassica straw treated with the aerobic fungus, *Trametes versicolor*. *Can. J. Anim. Sci.* 91:1-8.
- SAGARPA, 2017.http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines_/2017/enero/Documents/JAC_0015-10.PDF. Consultado el 21 de junio del 2017.
- SAS. Institute Inc. 2013. *Statistical Analysis System, SAS, User's Guide*: SAS Inst., Cary, NC.
- Seradj, A. R., Abecia, L., Crespo, J., Villalba, D., Fondevila, M., Balcells, J. 2014. The effect of Bioflavex® and its pure flavonoid components on in vitro fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high concentrate diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197:85-91.
- Shafiya, R., Rajkumari, K., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., Ahmad, G. Nayik. 2016. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *J. of the Saudi Society of Agric. Sci.* Pp. 1-8.
- Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Sallam, S. M. A., Louvandini, H. & Abdalla, A. L. 2012. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *J. Anim. Feed Sci.* 21:759-772.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.

- Vallejo H, L, A. 2014. Modificación de las variables de degradación y fermentación *in vitro* e *in situ* de una dieta con una fitasa exógena para borregos en crecimiento. pp 1-30.
- Van Dung, D., Shang, W & Yao, W. 2014. Effect of crude protein levels in concentrate and concentrate levels in diet on *in vitro* fermentation. Asian Australas. J. Anim. Sci. 27 (6):797-805.
- Volanis, M., Zoiopoulos, P., Tzerakis, K. 2004. Effects of feeding ensiled sliced oranges to lactating dairy sheep. Small Ruminant Res. 53:15-21.
- Zeky, Berk. 2016. Products of the citrus processing industry. Pp. 216-233.

CAPÍTULO II. BIOACCESIBILIDAD DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES DE PULPA DE NARANJA EN CARNEROS

Juan C. Torres-Ramirez¹; David Hernández-Sánchez^{1*}; José R. Bárcena-Gama¹; María M. Crosby-Galván¹; Nicolás Torres-Salado²; Benigno Ruíz-Sesma³

¹Posgrado de Ganadería, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Campus Motecillo, km 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Municipio de Texcoco, Edo. de México. sanchezd@colpos.mx*; ²Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero; ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas.

Resumen

La pulpa de naranja deshidratada (PND) representa una fuente importante de fenoles y flavonoides, los cuales son considerados como nutraceuticos por su actividad antioxidante en la carne. El objetivo del presente estudio fue determinar la bioaccesibilidad de fenoles (FeT) y flavonoides (FIT) totales en duodeno con contenidos crecientes de PND en la dieta (0, 17.5, 35, 52.5 %). Para ello, se desarrolló una prueba de degradación *in situ* (DISMS) con carneros provistos con canula ruminal y duodenal, en donde 0.5 g de cada dieta fueron incubadas por duplicado en la porción ventral del rumen a las 48 h, para evaluar la degradación *in situ* de la MS (DISMS), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA). Se recolectaron muestras de líquido ruminal y contenido duodenal a 0, 4, 8, 12 y 24 h después de suministrar el alimento para medir el pH y determinar las concentraciones de FeT y FIT. Se utilizó un diseño en Cuadro Latino 4 x 4 y las medias de tratamientos se

compararon con la prueba de Tukey. La DISMS fue superior ($P<0.05$) en el T4= 78.57^a %, respecto a los tratamientos T1=68.66^b, T2=70.10^b y T3=72.95^b. La concentración de FeT y FIT en líquido ruminal fue mayor ($P<0.05$) en el T4, en los horarios 0, 4, 8, 12 y 24 h, y en contenido duodenal, el T3 y T4 mostraron las concentración más alta ($P<0.05$) a las 12 h. La bioaccesibilidad de FeT disponibles para la absorción intestinal fue mayor ($P<0.05$) en los carneros del T4 con respecto a los del grupo testigo y la bioaccesibilidad de FIT fue superior ($P<0.05$) para los tratamientos que incluyeron PN (T2, T3 y T4), sin diferencia para esta variable entre estos. La inclusión de 52.5 % de PN favorece el mejor aporte de polifenoles y flavonoides totales en duodeno, bioaccesibles para ejercer efecto antioxidante.

Palabras clave: Flavonoides, polifenoles, bioaccesibilidad, pulpa de naranja, borregos.

Abstract

Orange pulp (OP) represents an important source of phenols and flavonoids, considered as nutraceuticals because of their antioxidant activity. The objective of the present study was to determine the bioaccessibility of total phenols (TPh) and flavonoids (TFI) in duodenum with increasing levels of dehydrated OP in the diet (0, 17.5, 35, 52.5%). An *in situ* digestibility test (DISMS) was carried out using four rams provided with ruminal and duodenal fistula, where 0.5 g of each diet were incubated in duplicate in the rumen ventral portion at 48 h, to evaluate *in situ* DM digestibility (ISDMD), NDF, ADF. Ruminal fluid and duodenal contents samples were collected at 0, 4, 8, 12, and 24 h after animal feeding to measure pH and determine phenols (FeT) and total flavonoids (FIT) concentrations. A square latin design 4 x 4 was used and the means of treatments were compared with Tukey test. The ISDMD was higher ($P<0.05$) in T4 = 78.57^a % than T1 = 68.66^b, T2 = 70.10^b and T3 = 72.95^b treatments. The concentration of TPh and TFI in ruminal fluid was higher ($P<0.05$) in rams

of the T4, at 0, 4, 8, 12 and 24 h, and in duodenal content, T3 and T4 showed the highest concentration ($P<0.05$) at 12 h. The bioaccessibility of TFh available for intestinal absorption was greater ($P<0.05$) in T4 rams than in the control group and the bioaccessibility of TF1 was higher ($P<0.05$) for treatments that included OP (T2, T3 and T4), without difference between these. The inclusion of 52.5% of OP improved the best contribution of total polyphenols and flavonoids in duodenum, bioaccessible for antioxidant effect.

Key words: Flavonoids, polyphenols, bioaccessibility, orange pulp, lambs.

Introducción

La pulpa de naranja (PN) es un subproducto de la industria cítrica utilizado en la alimentación de rumiantes (Lashkari *et al.*, 2014), puede adicionarse fresco, ensilado o deshidratado (Lashkari y Taghizadeh, 2015). La importancia de estos subproductos radica en el potencial de reemplazar el uso de granos en la dieta de rumiantes y la respuesta estará en función del nivel de inclusión, observándose mejoras en el comportamiento animal cuando se incluye 40 % de PN, pero con niveles de 65 % causa trastornos metabólicos después de utilizarse por periodos largos (Bueno *et al.*, 2002).

Los subproductos de la naranja representan una fuente importante fenoles y flavonoides (Lagha-Benamrouche y Madani, 2013), considerados como nutraceuticos por su actividad antioxidante (Escobedo-Avellaneda *et al.*, 2014), al presentar uno o más grupos fenólicos en su estructura, actúan como metal-quelantes de radicales libres (Zong-Tsi *et al.*, 2012). En los cítricos, los flavonoides están presentes como flavononas, describiéndose la neoeriocitrina, naringenina, narirutina y neohesperidina en la naranja amarga (*Citrus aurantium*) (Ramful *et*

al., 2011), la hesperidina en la naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Escobedo-Avellaneda *et al.*, 2014) y naringenina en la cáscara de toronja (*Paradisi citrus*) (Seradj *et al.*, 2014).

Los flavonoides deben ser liberados de la matriz del alimento para ejercer su efecto biológico, a este proceso se le denomina bioaccesibilidad fenólica y es la cantidad de polifenoles disponibles para la absorción intestinal (Ahmad-Qasem *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2016; Karás *et al.*, 2017) y la biodisponibilidad fenólica es la fracción de polifenoles liberados en la circulación para el metabolismo en los tejidos (Rodríguez *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2016; Karás *et al.*, 2017).

En la literatura se ha documentado el uso de pulpa de naranja con el aumentó en la estabilidad oxidativa en la carne de corderos (Simitzis *et al.*, 2013; Inserra *et al.*, 2014; Luciano *et al.*, 2017), por la actividad antioxidante de los fenoles y flavonoides presentes; sin embargo, se desconocen los contenidos óptimos de estos compuestos para propiciar el efecto antioxidante y no se encontraron estudios en la literatura relacionados con la estabilidad de los fenoles y flavonoides de la PN a su paso por el rumen. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar la bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides usando dietas con contenidos crecientes de PN.

Materiales y métodos

Localización

El ensayo se realizó en la unidad metabólica y en el Laboratorio de Nutrición Animal, pertenecientes al Posgrado de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Se realizó una prueba metabólica con borregos fistulados en rumen y duodeno, para conocer la estabilidad de polifenoles y flavonoides a su paso por el rumen. La inclusión de pulpa de

naranja deshidratada (PND) en las dietas se estableció de acuerdo al contenido de hesperidina (Hes), el flavonoide de mayor importancia antioxidante, con niveles de 0, 1500, 3000 y 4500 mg Hes kg MS⁻¹, para el T1, T2, T3 y T4, respectivamente. La composición química de las dietas experimentales y los tratamientos se presentan en el (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química de las dietas experimentales y tratamientos evaluados

	T1	T2	T3	T4
Ingredientes, %				
Pulpa de cítrico deshidratada	0	17.5	35	52.5
Maíz quebrado	50	50	31	12
Pasta de soya	20	20.5	22	23
Melaza	4	1	1	1
Paja de avena	25	10	10	10
Premezcla mineral	1	1	1	1
Composición química¹				
Energía Metabolizable, Mcal kg ⁻¹	2.78	2.94	2.81	2.92
PC, %	16.30	16.10	16.07	16.04
EE%	3.07	3.36	3.22	3.07
FDN, %	23.23	18.08	20.83	23.58

¹MS: materia seca, todos los demás valores están en base materia seca. PC= proteína cruda; EE= extracto etéreo; FDN= fibra detergente neutro; 0, 1500, 3000 y 4500 mg Hes kg⁻¹ MS, para el T1, T2, T3 y T4, respectivamente.

Muestras de pulpa de naranja (cascara y pulpa) se secaron en una estufa de aire forzado a 40°C por 48 h, posteriormente la muestra fue molida (1 mm) y almacenada en bolsas Ziploc.

Determinación de hesperidina en la pulpa de naranja

La extracción de hesperidina se realizó de acuerdo al método propuesto por Chang *et al.* (2002), se pesaron 250 mg de muestra y se colocaron en tubos Eppendorf (2.0 mL), añadiendo 1 mL de metanol (MeOH) al 80% e se incubaron en baño maría a 40°C por 1 h, después se centrifugaron a 5031 x g durante 10 min. Se transfirieron 500 µL del sobrenadante en tubos Eppendorf (2.0 mL) y se inyectaron 15 µL en un cromatógrafo de líquidos (HPLC System, Agilent Hewlett Packard® mod 1100, USA).

Extracción de fenoles y flavonoides totales

El procedimiento de extracción de fenoles y flavonoides totales se realizó según la técnica descrita por Chun *et al.* (2003) y Franke *et al.* (2004).

Determinación de Fenoles totales

La determinación de fenoles totales (FeT) de la PND se realizó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu según la técnica descrita por Singleton y Rossi (1965). Se registró la lectura de la absorbancia a 685 nm en un espectrofotómetro (CARY 1-E Varian®, USA) y la concentración de FeT se calculó con respecto a la curva estándar de ácido gálico (0 a 12 mg mL⁻¹). Los resultados se expresaron en miligramo de ácido gálico por gramo MS de PN.

Determinación de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales (FIT) se obtuvo por el método colorimétrico descrito por Zhishen *et al.* (1999). Se registró la lectura de la absorbancia a 370 nm en un espectrofotómetro (CARY 1-E Varian®, USA) y la concentración de FIT se calculó con

respecto a la curva estándar de hesperidina (50 a 200 mg mL⁻¹). Los resultados se expresaron en miligramos de hesperidina por gramo MS de PN.

Prueba metabólica

En la prueba metabólica se utilizaron cuatro carneros de la raza Suffolk x Dorset (45 ± 2 kg PV), fistulados en rumen y duodeno, alojados en jaulas metabólicas individuales. Al inicio del experimento los animales fueron desparasitados con Ivermectina[®] 1 % (0.5 mL 25 kg⁻¹ PV, vía IM) y vitaminados (ADE, 1 mL 50 kg⁻¹ PV, vía IM). Las dietas experimentales se suministraron dos veces al día (7:00 y 16:00 h) y el agua *ad libitum*. Antes del estudio metabólico, los borregos fueron adaptados 12 d a las dietas experimentales y el manejo de los ovinos se realizó de acuerdo al Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados (CP, 2016). La ingesta de materia seca se calculó con base al 5 % del peso corporal. El experimento se distribuyó en un diseño cuadro latino 4 x 4, cuatro períodos de 15 d, 12 de adaptación a la dieta y 3 para la recolección de muestras.

Caracterización química de las dietas

Durante la prueba metabólica se recolectaron muestras de cada una de las dietas experimentales y se elaboraron muestras compuestas por periodo para determinar el contenido de materia seca (MS), proteína cruda (PC), cenizas (CEN) y extracto etéreo (EE) (AOAC, 2005), y fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA) (Van Soets *et al.*, 1991).

Degradación *in situ*

La digestibilidad *in situ* de la MS (DISMS), FDN y FDA se determinó por duplicado en 0.5 g de muestra de cada dieta experimental con el uso de bolsas ANKOM[®] F57. Las bolsas con la muestra fueron incubadas en la porción ventral del rumen a las 48 h (Salinas *et al.*, 2011),

posteriormente se retiraron, se lavaron con agua corriente, se secaron en una estufa de aire forzado a 55 °C por 24 h hasta peso constante y se pesaron.

pH en líquido ruminal y duodenal

En cada periodo experimental, durante tres días consecutivos, se recolectaron 10 mL de líquido ruminal y contenido duodenal a 0, 4, 8, 12 y 24 h después de suministrar el alimento. Las muestras fueron filtradas a través de una capa doble de gasas y se midió inmediatamente el pH con un potenciómetro portátil (ORION[®], modelo SA 210, USA).

Fenoles y flavonoides en líquido ruminal y contenido duodenal

Las muestras utilizadas para la medición del pH, fueron congeladas a -20 °C para análisis posterior de fenoles y flavonoides totales, y hesperidina mediante los métodos descritos previamente.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue un Cuadro Latino 4 x 4, 4 niveles de PN y 4 periodos de evaluación. Los resultados de la degradación *in situ* y variables ruminales se analizaron con el procedimiento GLM (SAS, 2013), las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey (Steel *et al.*, 1997).

Resultados y discusión

Degradación *in situ* de MS, FDN, FDA

La degradación *in situ* de la materia seca (DISMS) y FDN (Cuadro 2) fue superior ($P < 0.05$) en el T4 con la inclusión de 52.5 % de pulpa de naranja deshidratada (PND) y resultó similar ($P > 0.05$) entre los tratamientos con T1, T2 y T3. La degradación de la FDA fue baja ($P > 0.05$) en T2 y los valores más altos se registraron en el T1 y T4, entre los cuales no existió

diferencia. La DISMS en el T4 se explica por el aporte de carbohidratos fermentables en la dieta con la PND, principalmente pectinas (Piquer *et al.*, 2009), las cuales estimulan el crecimiento microbiano y propician mayor degradación de la MS (Arriola *et al.*, 2011; Gado *et al.*, 2011). Además, la alta DISMS observada en este estudio se relaciona con el contenido de carbohidratos (80% MS) remanentes en la pulpa de cítricos (Lashkari y Taghizadeh, 2015), de los cuales 35 % son de fácil fermentación (Lashkari y Taghizadeh, 2013) y se estimulan la DISMS, sobre todo cuando la dieta incluye niveles altos de PND como ocurrió en el T4 (52.5 % PND).

Cuadro 2. Digestibilidad *in situ* de la MS, FDN, FDA de dietas elaboradas con contenidos crecientes de pulpa de naranja

Tratamientos	Niveles de pulpa de naranja deshidratada, %				EEM*
	T1	T2	T3	T4	
Digestibilidad, %					
MS	68.66 ^b	70.10 ^b	72.95 ^b	78.57 ^a	1.356
FDN	34.34 ^b	33.01 ^b	33.35 ^b	38.00 ^a	1.134
FDA	18.54 ^a	16.45 ^c	17.07 ^b	19.06 ^a	0.062

T1, T2, T3 y T4 con 0, 17.5, 35 y 52.5% de PND, respectivamente. EEM*= Error estándar de la media; ^{a, b, c} Valores con distinta literal en hilera indican diferencias (P<0.05).

La resultados de DISMS observados en este estudio al incluir PDN resultan superiores a lo reportado por López *et al.* (2016) y Bueno *et al.* (2002) cuando se incluye la PND en la dieta en contenidos similares. Asimismo, la mayor degradación de la FDN observada en el T4 se explica por el alto contenido de fibra soluble presentes en la pulpa de cítricos (36 %), la cual es utilizada por los microorganismos del rumen (Gado *et al.*, 2011; Lashkari y Taghizadeh, 2013).

Además, la pectina de la PND produce más acetato (Liu *et al.*, 2014) y menos lactato en comparación con el almidón (Hall *et al.*, 1998), creando mejores condiciones en el rumen para la fermentación de las fibras (Gholizadeh y Naserian, 2010). Sin embargo, la digestión de la FDN varía con la composición química de la dieta (Rodríguez-Prado *et al.*, 2004 y Arriola *et al.*, 2011), tamaño de partícula, tasa de digestión y velocidad de flujo (Firkins *et al.*, 1998; Arriola *et al.*, 2011). A pesar de que las dietas de los tratamientos evaluados tuvieron una composición química y tamaño de partícula similar, la digestión de la FDN fue diferente entre estos y fue mayor en el T4 con respecto al T1. Aún cuando estos contenían similar porcentaje de FDN, indicando que el contenido de inclusión de PND influyó en estos resultados.

pH ruminal y duodenal

Los valores de pH registrados en los diferentes horarios estuvieron dentro del intervalo reportado en rumen (Russell *et al.*, 1992; Piquer *et al.*, 2009). No se observaron diferencias ($P > 0.05$; Cuadro 3) entre tratamientos en los valores de pH ruminal. Los resultados de este estudio son congruentes con los valores de pH reportados por Piquer *et al.*, (2009) al incluir 13, 26 y 39 % de pulpa de naranja y con el pH observado por Balcells *et al.* (2012) al incluir extractos de flavonoides de naranja amarga y toronja en la dieta de rumiantes.

Cuadro 3. pH, en dietas elaboradas con contenidos crecientes de pulpa de naranja incubadas *in situ*

Variables	Horarios de incubación				
Nivel de PND, %	0	4	8	12	24
pH ruminal					
T1	6.88	5.77	6.34	5.28	6.85
T2	6.29	5.45	5.68	5.29	6.68
T3	6.53	5.56	5.71	5.19	6.48
T4	6.52	5.68	5.61	5.50	6.54
EEM*	0.096	0.079	0.241	0.060	0.053
pH Duodenal					
T1	2.11	1.84	2.18	2.10	2.23
T2	2.05	1.89	2.06	1.93	2.27
T3	2.07	1.90	1.94	1.95	2.04
T4	2.06	1.93	2.10	2.03	1.99
EEM*	0.025	0.012	0.380	0.047	0.039

T1, T2, T3 y T4 con 0, 17.5, 35 y 52.5% de PND, respectivamente. No existieron diferencias ($P>0.05$); EEM*= Error estándar de la media.

En esta investigación, los valores de pH ruminal en las primeras cuatro horas después de la alimentación se ubicaron entre 5.28 y 5.68, indicando condiciones propicias para la actividad enzimática (Tripathi y Karim, 2011).

Fenoles totales en líquido ruminal y duodenal

La concentración de fenoles totales (FeT) en líquido ruminal fue mayor ($P<0.05$; Cuadro 4) en el T4 en los horarios evaluados. En líquido duodenal, no se observó una tendencia definida

ya que a las 0 h la mayor ($P<0.05$) concentración de FeT se observó en el T4, a las 4 h en el T2, a las 8 y 24 h en el T3 con respecto al grupo testigo y a las 12 h la mayor concentración de FeT ocurrió en el T3 y T4. La concentración de FeT en líquido ruminal observada en el T3 y T4 se relacionó con los contenidos más altos de pulpa de naranja en la dieta.

Cuadro 4. Fenoles totales en líquido ruminal y duodenal (mg AG g⁻¹) de carneros alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja

Variables	Horarios				
	0	4	8	12	24
Líquido ruminal					
T1	3.34 ^b	2.46 ^d	5.80 ^b	3.77 ^c	2.85 ^c
T2	3.89 ^b	4.82 ^c	5.36 ^b	6.77 ^b	5.05 ^b
T3	6.95 ^a	5.88 ^b	6.35 ^b	7.55 ^{ba}	4.88 ^b
T4	7.13 ^a	9.56 ^a	9.11 ^a	9.09 ^a	7.34 ^a
EEM*	0.433	0.247	0.306	0.635	0.255
Líquido duodenal					
T1	7.80 ^c	12.30 ^d	20.40 ^b	18.35 ^c	19.70 ^d
T2	17.60 ^b	22.70 ^a	22.75 ^{ba}	22.40 ^b	22.25 ^c
T3	18.15 ^b	16.55 ^c	24.65 ^a	26.05 ^a	26.15 ^a
T4	19.80 ^a	19.95 ^b	21.45 ^{ba}	25.35 ^a	23.60 ^b
EEM*	0.137	0.801	0.561	0.762	0.275

AG= Ácido galico; T1, T2, T3 y T4 con 0, 17.5, 35 y 52.5% de PND, respectivamente.

EEM*= Error estándar de la media; ^{a, b, c, d} Valores con distinta literal en columna indican diferencias ($P<0.05$).

Sin embargo, las concentraciones de FeT determinadas en líquido duodenal no son concluyentes entre tratamientos y se puede explicar por las reacciones de estos compuestos durante el metabolismo ruminal; a este respecto se han descrito interacciones entre fenoles y moléculas de los alimentos como reacciones hidrófobas no covalentes (Yuksel *et al.*, 2010) como en el caso de las interacciones entre polifenoles con proteínas (Frazier *et al.*, 2010; Shpigelman *et al.*, 2010) y carbohidratos (Saura-Calixto, 2011). Esto puede explicar las concentraciones de FeT observadas en contenido duodenal al incluir contenidos altos de almidón (T2), el cual se liga con los FeT, protegiéndolos de la degradación ruminal debido a la presencia de anillos aromáticos hidrofóbicos y grupos hidroxilo hidrofílicos capaces de enlazar polisacáridos (Serrano *et al.*, 2009; Saura-Calixto, 2010). Adicionalmente los FeT reaccionan con el grupo carboxilo del ácido urónico de la hemicelulosa y pectina, y el grupo hidroxilo presente en la celulosa (Metzler y Mosenthin, 2008), para evitar la oxidación de fenoles en rumen y propiciar el flujo de estos a duodeno (Chanteranne *et al.*, 2008; Saura-Calixto, 2010; Jakobek, 2015). Lo anterior se pudo constatar en las concentraciones de FeT determinadas en duodeno en este estudio al incrementar los niveles de pulpa de naranja en la dieta, indicando baja degradación ruminal. Lo anterior se sustenta en estudios previos donde se reporta que el extracto de fenoles se ligan a las fracciones de MO, FDN y carbohidratos totales (Ozturk *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012); además, los FeT disminuyen la concentración y actividad microbiana ruminal implicando una disminución en su degradación (Morsy *et al.*, 2015; de Paula *et al.*, 2016).

Flavonoides en líquido ruminal y duodenal

La concentración de flavonoides totales (FIT) en líquido ruminal fue mayor ($P < 0.05$; Cuadro 5) en el T4 en los horarios evaluados, y a las 0 y 12 h la concentración de FIT en el T3 resultó

similar al T4. En líquido duodenal, no se observó una tendencia definida en la concentración de FIT, observándose los valores más altos ($P<0.05$) en el T2 a las 0, 4, 12 y 24 h con respecto al grupo testigo, y la concentración determinada en el T4 a las 4 h, y en el T1 a las 8 y 24 h resultando similares al T2.

Cuadro 5. Flavonoides contenidos en líquido ruminal y duodenal (mg Hes g^{-1}) de carneros alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja

Variables	Horarios				
	0	4	8	12	24
Líquido ruminal					
T1	12.00 ^b	12.05 ^c	12.55 ^c	11.85 ^b	11.00 ^c
T2	11.80 ^b	10.35 ^d	11.50 ^d	10.80 ^c	10.60 ^c
T3	16.05 ^a	15.50 ^b	15.25 ^b	18.00 ^a	14.00 ^b
T4	16.12 ^a	18.55 ^a	17.10 ^a	18.50 ^a	17.00 ^a
EEM*	0.356	0.019	0.211	0.227	0.136
Líquido duodenal					
T1	13.50 ^b	16.47 ^b	18.05 ^a	17.80 ^b	21.15 ^a
T2	19.50 ^a	20.15 ^a	17.12 ^{ba}	20.35 ^a	20.55 ^a
T3	14.80 ^b	16.95 ^b	16.35 ^b	17.50 ^{bc}	16.95 ^b
T4	13.47 ^b	19.00 ^a	16.65 ^b	17.00 ^c	17.35 ^b
EEM*	0.660	0.552	0.429	0.110	0.450

Hes= Hesperidina; T1, T2, T3 y T4 con 0, 17.5, 35 y 52.5% de PND, respectivamente.

EEM*= Error estándar de la media; ^{a, b, c} Valores con distinta literal en columna indican diferencias ($P<0.05$).

La concentración de FIT en líquido ruminal registrada en el T4 se relacionó con los contenidos más altos de pulpa de naranja en la dieta, observándose una relación positiva en el incremento de FIT a medida que aumentaba el contenido de pulpa de naranja en la dieta. Sin embargo, las concentraciones de FIT determinadas en contenido duodenal no son concluyentes entre tratamientos y se pueden explicar por las reacciones de estos compuestos durante el metabolismo ruminal, en el cual existe una hidrólisis y liberación del aglicón, responsable de ejercer el efecto antioxidante después de su absorción intestinal (Chanteranne *et al.*, 2008) lo cual propicia una disminución de FIT determinada en duodeno. Esto explica el resultado observado en la concentración de FIT con los contenidos más altos de PND, donde a pesar de existir degradación de flavonoides en rumen, el flujo de FIT a duodeno fue superior en el T3 y T4. En la literatura disponible existen escasas evidencias de actividad de flavonoides en la fermentación microbiana ruminal, informándose que extractos de naringina deprimen la actividad bacteriana por la interrupción de la fuerza motriz protón y en algunos especies inhibe la motilidad (Gladine *et al.*, 2007), indicando que la degradación de los flavonoides por las bacterias puede ser baja. Además, los flavonoides de cítricos tienen actividad favorable en el ambiente ruminal cuando se utilizan dietas concentradas o bajo inducción de acidosis por estabilizar el pH ruminal (De Freitas *et al.*, 2007; Balcells *et al.*, 2012) y reducir la producción de gas (Seradj *et al.*, 2014), explicándose por la inhibición de bacterianas específicas. En contraste, se ha documentado la degradación de los FIT por algunos géneros bacterianos del rumen (Tzounis *et al.*, 2008). Lo anterior explica la variabilidad en la concentración de FIT a nivel duodenal observada en este estudio, ante una posible degradación de estos a su paso por el rumen.

Bioaccesibilidad de fenoles y flavonoides

Las dietas elaboradas con niveles crecientes de PND presentaron diferencias ($P < 0.05$; Cuadro 6) en la concentración de fenoles (FeT) y flavonoides totales (FIT), los cuales incrementaron conforme aumentó el contenido de inclusión de PND en la dieta. La mayor ($P < 0.05$) excreción de FeT ocurrió en el T3 y de FIT en el T4. La bioaccesibilidad de FeT fue mayor ($P < 0.05$) en las carneros del T4 con respecto a los del grupo testigo y la bioaccesibilidad de FIT fue superior ($P < 0.05$) en los animales del T2, T3 y T4 con respecto a los del grupo testigo, sin observar diferencia ($P > 0.05$) en los grupos suplementados con PND.

Cuadro 6. Bioaccesibilidad de fenoles (mg AG g⁻¹) y flavonoides (mg Hes g⁻¹) totales en dietas y heces de carneros alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja

Variables	Tratamientos				
Muestra analizada	T1	T2	T3	T4	EEM*
	----- mg AG g ⁻¹ MS -----				
FeT en la dieta	3.44 ^d	5.96 ^c	8.36 ^b	10.40 ^a	0.456
FeT en heces	1.54 ^d	3.80 ^b	4.61 ^a	2.69 ^c	0.256
Bioaccesibilidad de FeT	1.9 ^d	2.16 ^c	3.75 ^b	7.71 ^a	0.125
	----- mg Hes g ⁻¹ MS -----				
FIT en la dieta	24.80 ^d	31.90 ^c	35.76 ^b	36.34 ^a	0.235
FIT en heces	7.17 ^d	8.86 ^c	12.75 ^b	14.16 ^a	0.764

Bioaccesibilidad de FIT	17.63 ^b	23.04 ^a	23.01 ^a	22.18 ^a	0.658
-------------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-------

AG= Ácido gálico; Hes= hesperidina; FeT= Fenoles totales; FIT= Flavonoides totales; T1, T2, T3 y T4 con 0, 17.5, 35 y 52.5% de PND, respectivamente. EEM*= Error estándar de la media; ^{a, b, c, d} Valores con distinta literal en hilera indican diferencias (P<0.05).

La bioaccesibilidad se define como la cantidad de polifenoles disponibles para la absorción intestinal (Ahmad-Qasem *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2016; Karás *et al.*, 2017), y la bioaccesibilidad de FeT y FIT observada en este estudio se relacionó positivamente con los incrementos en el contenido de inclusión de PND en la dieta y tuvo su máxima concentración los carneros alimentados con la dieta del T4 y a su vez favoreció la absorción intestinal de los compuestos bioactivos evaluados en el presente estudio. La bioaccesibilidad y absorción se relaciona con la desglicosilación de los FeT y FIT ocasionada por la enzima lactasa-floricin hidrolasa (LFH) presente en las células epiteliales del intestino delgado (Gonzales *et al.*, 2015; Gonzales *et al.*, 2016) y en el caso de los FIT, las agliconas se transportan a través de las células epiteliales por difusión pasiva (Day *et al.*, 2000), después es transportada del enterocito al hígado vía porta-hepática (Donovan *et al.*, 2006; Stalmach *et al.*, 2010). Por otra parte, los FeT son transportados en las células epiteliales, a través de proteínas de transporte sodio-glucosa localizadas en la mucosa del intestino delgado (Day *et al.*, 2000), y dentro del enterocito los FeT sufren una serie de reacciones de metilación, glucuronidación y sulfatación, con el fin de atenuar el efecto prooxidante y citotóxico de estos compuestos (Donovan *et al.*, 2006). Sin embargo, se desconoce si altas concentraciones de Fet y FIT compiten con otros nutrientes por los puntos de absorción en intestino delgado y esto afecte la bioaccesibilidad de los mismos.

La absorción de una proporción alta de FeT y FIT contenidos en la dieta también se ha documentado en animales (Besle *et al.*, 2010), humanos (Crozier *et al.*, 2010), cerdos (Cermak *et al.*, 2003), ratas (Morand *et al.*, 2000) y perros (Reinboth *et al.*, 2010), indicando la alta bioaccesibilidad de estos compuestos el tubo digestivo para ejercer su efecto antioxidante.

Conclusiones

Con base en los resultados de este estudio se concluye que el contenido de inclusión de 52.5 % de pulpa de naranja deshidratada en la dieta de carneros es recomendable para mejorar la degradación de la materia seca y de fibra, y favorecer la bioaccesibilidad de alta proporción fenoles y flavonoides contenidos en la dieta. Estudios posteriores deberán evaluar el efecto antioxidante de estos compuestos y su relación con la bioaccesibilidad.

Literatura citada

- Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barraón-Catalán, E., Carreres, J. E., Micol, V., & García-Pérez, J. V. 2014. Influence of olive leaf processing on the bioaccessibility of bioactive polyphenols. *J. Agric. Food Chemistry*. 62:6190-6198.
- ANKOM Technology. 2006. Operators manual ANKOM 200/220 Fiber Analyzer. Ankom Technology, Macedon, New York. USA. 27 p.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis of AOAC International. 2005. 18th edition. USA. 176 p.

- Balcells, J. Aris, A., Serrano, A., Seradj A, R., Crespo, J., Devant, M., 2012. Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 90:4975-4984.
- Besle, J, M., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdague, J, L., Fraisse, D, F., Lamaison, J, L., and Coulon, J, B. 2010. Ultraviolet absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *J. Dairy Sci.* 93:2846-2856.
- Bueno, M, S., Ferrari, E., Blanchini, D., Leinz, F, C., & Rodríguez, F. 2002. Effect of replacing corn with dehydrated citrus pulp in diets of growing kids. *Small Rum. Res.* 46:179-185.
- Cermak, R., Landgraf, S., & Wolfram, S. 2003. The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *The Journal of Nutrition.* 133(9): 2802-2807.
- Chang, C., Yang, H. Wen and J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Analysis.* 10:178-182.
- Chun, O. K., Kim, D. O., Moon, H. Y., Kang, H. G., & Lee, C. Y. 2003. Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *J. Agricultural Food Chem.* 51:7240-7245.
- Costa, Jr., J.B.G., Zeoula, L. M., Franco, S. L., de Moura, L. P. P., Valero, M. V., Simioni, F. L., da Paula, E. M., Samensari, R. B. 2012. Effect of propolis product on digestibility and ruminal parameters in buffaloes consuming a forage-based diet. *Ital. J. Anim. Sci.* 11:4-15.

- Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., Mclauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G.W., Morgan, M. R., Williamson, G. 2000. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phloridzin hydrolase. *FEBS Lett.* 468:166-170.
- De Freitas, J. A., De Souza, J. C., Lana, R. P., Antonangelo, R. P., De Freitas, A. A. and De Santana, R. T. S. 2007. Ethanolic extract of propolis in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 90(1):105-106.
- Donovan, J. L., Manach, C., Faulks, R. M., Kroon, P. A. 2006. Absorption and metabolism of dietary secondary metabolites. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* Blackwell Publishing, Oxford, New York. Pp. 303-351.
- Escobedo-Avellaneda, Z., Gutiérrez-Urbe, J., Valdez-Fragoso, A., Torres, J, A., Welti-Chanes, J. 2014. Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. *J. Funtional Foods.* 6:470-481.
- Firkins, J. L., Allen, M. S., Oldick, B. S. 1998. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *J. Dairy Sci.* 81:3350-3369.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Arakaki, C., & Murphy, S. P. 2004. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *J. Food Composition Analysis.* 17:1-35.

- Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J. 2010. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *J. Pharmaceutical Biomedical Analysis*. 51:490-495.
- Gado, H. M., Salem, A. Z. M., Odongo N. E., Borhami, B. E. 2011. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165:131-136.
- Gholizadeh, H. & Naserian, A. A. 2010. The effects of replacing dried citrus pulp with barley grain on the performance of Iranian Saanen kids. *J. Anim. Vet. Adv.* 9:(15):2053-2056.
- Gladine, C., Roca, E., Morand, C., Bauchart, D., Durand, D. 2007. The bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single acute dose, in sheep made them highly susceptible to lipoperoxidation. *British J. Nutrition*. 98: 691-701.
- González, G. B., Smaghe, G., Mackie, A., Grootaert, C., Bajka, B., Rigby, N., Raes, K., Katleen, C. J. V. 2015. Use of metabolomics and fluorescence recovery after photobleaching to study the bioavailability and intestinal mucus diffusion of polyphenols from cauliflower waste. *J. Functional Foods*. 16:403-413.
- Hall, M. B., Pell, A. N. & Chase, L. E. 1998. Characterization of neutral detergent soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes. *Anim. Feed Sci. Tech.* 70:23-39.
- Insera, L., Priolo, A., Biondi, L., Lanza M., Bognanno M., Gravador, R., Luciano, G. 2014. Dietary citrus pulp reduces lipid oxidation in lamb meat. *Meat Sci.* 96:1489-1493.

- Jakobek, L. 2015. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*. 175:556-567.
- Karás, M., Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Zlotek, U. & Zielinska, E. 2017. Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *Int. J. Food Science Technol.* 52:291-305.
- Lagha-Benamrouche, S., Madani, Khodir. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis L.* and *Citrus aurantium L.*) cultivated in Algeria:Peels and leaves. *Industrial Crops Prod.* 50:723-730.
- Lakhdara, N., Benazzouz, H., Bererhi, H., Benattallah, A., Gherroucha, D., Bouaziz, O. 2014. Effect of the incorporation of date pits and orange pulp in rations composed of wheat straw and concentrate on the blood biochemical parameters of Ouled Djellal breeding. *International Academy of Ecology and Environmental Sciences*. 3:93-96.
- Lashkari, S., Taghizadeh, A. 2015. Digestion kinetics of carbohydrate fractions of citrus by-products. *Veterinary Res. Forum.* 6:4-48.
- Liu, J., Pu, Y, Y., Xie, Q., Wang, J. K., & Liu, J. X. 2014. Pectin induces an in vitro rumen microbial population shift attributed to the pectinolytic *Treponema* group. *Curr. Microbiol.* 70(1):67-74.
- Luciano, G., Roscini, V., Mattioli, S., Ruggeri, S., Gravador, R, S., Natalello, A., Lanza, M., De Angelis A., and Priolo A. 2017. Vitamin E is the major contributor to the antioxidant capacity in lambs fed whole dried citrus pulp. *Animal.* 11:411-417.

- Metzler, B. y Mosenthin, R. 2008. A review of interactions between dietary fiber and the gastrointestinal microbiota and their consequences on intestinal phosphorus metabolism in growing pigs. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 21(4):603-615.
- Morand, C., Manach, C., Crespy, V., & Remesy, C. 2000. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research.* 33(5):667-676.
- Morsy, A. S., Soltan, Y. A., Sallam, S. M. A., Kreuzer, M., Alencar, S. M., Abdalla, A. L. 2015. Comparison of the *in vitro* efficiency of supplementary bee propolis extracts of different origin in enhancing the ruminal degradability of organic matter and mitigating the formation of methane. *Anim. Feed Sci. Technol.* 199:51-60.
- Ozturk, H., Pekcan, M., Sireli, M., Fidanci, U. R. 2010. Effects of propolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 57:217-221.
- Piquer, O., Ródenas, L., Casado, C., Blas, E., Pascual, J, J. 2009. Whole citrus fruits as an alternative to wheat grain or citrus pulp in sheep diet: Effect on the evolution of ruminal parameters. *Small Rumin. Res.* 83:14-21.
- Prado, O. P. P d., Zeoula, L. M., Moura, L. P. P. d., Franco, S. L., Prado, I. N. d., Jacobi, G. 2010. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em bubalinos alimentados com dieta à base de forragem. *Revist. Bras. Zootec.* 39:2055-2065.
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O, I., Bourdon, E., Bahorun, T. 2011. Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International.* 44:2088-2099.

- Reinboth, M., Wolfram, S., Abraham, G., Ungemach, F. R. & Cermak, R. 2010. Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *The British Journal of Nutrition*. 104(2):198-203.
- Rodríguez-Prado, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. 2004. Effects of fiber content and particle size of forage on the flow of microbial amino acids from continuous culture fermenters. *J. Dairy Sci.* 87:1413-1424.
- Russell, J. B., O'Connort, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Snifen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3551-3561.
- Salinas-Chavira, J., Gutiérrez-González, J. C., García-Castillo, R., López-Trujillo, R., Duarte-Ortuño, A. 2011. Digestibilidad in situ de la materia seca de tres dietas para ovinos de engorda. *Agronomía Mesoamericana*. 22(2):379-385.
- SAS Institute. 2013. SAS version 9.4. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Saura-Calixto F. 2010. Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *J. Agric. Food Chem.* 59(1):43-49.
- Saura-Calixto, F. 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *J. Agric. Food Chem.* 59:43-49.
- Seradj, A. R., Abecia, L., Crespo, J., Villalba, D., Fondevila, M., Balcells, J. 2014. The effect of Bioflavex[®] and its pure flavonoid components on in vitro fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high concentrate diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197:85-91.

- Serrano J., Puupponen R. P., Dauer, A., Aura, A. M. y Saura Calixto, F. 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition Food Res.* 53(2):310-329.
- Shpigelman, A., Israeli, G., & Livney, Y. D. 2010. Thermally-induced proteinpolyphenol co-assemblies: Beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids.* 24:735-743.
- Simitzis, P. E., Ilias-Dimopoulos, V., Charismiadou, M, A., Biniari, E, E., Deligeorgis, S, G. 2014. The effects of dietary hesperidin supplementation on lamb performance and meat characteristics. *J. Anim. Sci.* 84:136-143.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American J. Enology Viticulture.* 16:144-153.
- Steel G.R., Torrie J. H. 1986. *Bioestadística: Principios y Procedimientos.* 2nd Edition. McGraw-Hill, México. 167-171 p.
- Tripathi, M. K., Karim, S. A. 2011. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. *Livestock Sci.* 135: 17-25.
- Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G. G. C., George, T., Leonczak, J., Gibson, G. R., Kwik-Uribe, C and Spencer, J. P. E. 2008. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Brit. J. Nutr.* 99:782-792.
- Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* O & B Books, Inc., U.S.A. 374 p.

- Yuksel, Z., Avci, E., & Erdem, Y. K. 2010. Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chem.* 121:450-456.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents of mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64:555-559.
- Zhiyong, H., Yadan, T., Maomao, Z., Shuang, Z., Guanjuan, T., Fang, Q., Jie, C. 2016. High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect in vitro bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. *Food Chem.* 24:107-116.
- Zong-Tsi, C., Heuy-Ling, C., Charng-Cherng, C., Chin-Chen C., Pin-Der, D. 2012. Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. *Food Chem.* 135:2119-2127.

**CAPÍTULO III. RESPUESTA PRODUCTIVA DE CORDEROS ALIMENTADOS
CON CONTENIDOS CRECIENTES DE PULPA DE NARANJA Y EFECTO
ANTIOXIDANTE EN LA CARNE**

Juan C. Torres-Ramirez¹; David Hernández-Sánchez^{1*}; José R. Bárcena-Gama¹; María M.
Crosby-Galván¹; Nicolás Torres-Salado²; Benigno Ruiz-Sesma³

¹Posgrado de Ganadería, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Campus Motecillo, km 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Municipio de Texcoco, Edo. de México. sanchezd@colpos.mx*; ²Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero; ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas.

RESUMEN

En la búsqueda de insumos económicos y de fácil disponibilidad, la pulpa de cítricos es un subproducto alternativo para la alimentación de rumiantes y con funciones nutracéuticas. El objetivo fue evaluar la respuesta productiva de corderos alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja (PN) y su efecto en la oxidación de lípidos en carne con contenidos crecientes de PN en la dieta como tratamientos (T) (T1=0, T2=13, T3=26 y T4=39 % PN respectivamente). La respuesta productiva se realizó en 60 d. Se utilizaron 32 corderos machos de la raza Hampshire, con un peso vivo inicial de 25±1 kg y se distribuyeron en cuatro tratamientos usando un diseño completamente al azar, con ocho repeticiones. Los corderos fueron sacrificados a los 60 d y se evaluó la ganancia diaria de peso (GDP), consumo de MS (CMS), conversión alimenticia (CA), biodisponibilidad de fenoles y flavonoides en

carne y la oxidación de lípidos durante la vida de anaquel a 1, 7, 14 y 21 días. Se utilizó un diseño experimental diseño completamente al azar y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. La inclusión de contenidos crecientes de PN en la dieta no afectó ($P>0.05$) las variables de respuesta productiva de los corderos; sin embargo, la concentración de fenoles totales fue mayor ($P<0.05$) en la carne de los corderos del T3 y T4 a 1, 7 y 14 d, y la mayor ($P<0.05$) concentración de flavonoides totales se obtuvo en la carne de los corderos del T3 y T4 los d 7, 14 y 21. La oxidación de lípidos fue superior ($P<0.05$) en la carne de los corderos del T1 y T2, donde se incluyeron los contenidos más bajos de PN (0 y 13 % PN, respectivamente). La inclusión de 26 y 39 % de PN en la dieta (T3 y T4, respectivamente) retrasó la oxidación de lípidos en la carne de corderos durante la vida de anaquel evaluada. Se concluye que los contenidos de inclusión de pulpa de naranja en la dieta de corderos evaluados en este estudio no afectan la respuesta productiva animal, indicando la factibilidad de sustituir granos por PN; además, incluir 26 y 39 % de PN reduce la oxidación de lípidos en la carne a 21 d de anaquel.

Palabras clave: Respuesta productiva, oxidación de lípidos, biodisponibilidad de fenoles y flavonoides, pulpa de naranja.

Introducción

En la búsqueda de insumos económicos y de fácil disponibilidad, la pulpa de cítricos es un subproducto alternativo para la alimentación rumiantes (Vasta *et al.*, 2008; Inserra *et al.*, 2014). En México, se cosechan alrededor de 4, 200, 000 t de naranja, de las cuales cerca del 50% corresponden a la cáscara, bagazo y semillas, y las principales entidades productoras son Veracruz, Tamaulipas y San Luis Potosí, aportando 67.9 % de la producción nacional

(SAGARPA, 2017). En este sentido, la pulpa de naranja debido a su alto contenido de compuestos bioactivos, son considerados como nutraceuticos por su actividad antioxidante (Escobedo-Avellaneda *et al.*, 2014), al contener uno o más grupos fenólicos en su estructura, actúan como metal-quelantes de radicales libres (Gómez-Estaca *et al.*, 2014).

El uso de conservadores sintéticos se ha relacionado con riesgos para salud al presentar actividad carcinogénica (Karpinska-Tymoszczyk 2014; Shah *et al.*, 2014). Por el contrario, el uso de antioxidantes naturales son inocuos, pueden prolongar la vida de anaquel, aumentan la aceptabilidad de la carne y su valor en el mercado (Inserra *et al.*, 2014; Luciano *et al.*, 2017). Congruente con lo anterior, se ha observado una reducción en la oxidación de los lípidos en carne de corderos al adicionar pulpa de cítricos en la dieta (Gravador *et al.*, 2014; Inserra *et al.*, 2014; Luciano *et al.*, 2017). Así mismo, los extractos de cítricos han aumentado la resistencia a la oxidación del lípido en albóndigas (Fernández-López *et al.*, 2005) y en carne de pavo (Contini *et al.*, 2012).

La pulpa de naranja contienen compuestos bioactivos, dentro de los cuales, los polifenoles, terpenos, carotenoides y ácido ascórbico exhiben propiedades antioxidantes (Abeyasinghe *et al.*, 2007; Trípoli, *et al.*, 2007). Estos compuestos bioactivos contienen grupos aromáticos hidroxilo capaces de eliminar radicales libres y son responsables de la actividad antioxidante en la carne (Simitzis *et al.*, 2013). Dentro de los compuestos bioactivos de la pulpa de naranja, la hesperidina es la más abundante (Garg *et al.*, 2001), y después de ser absorbida en intestino delgado, se distribuye a través del sistema circulatorio del animal y se fija en los tejidos para disminuir la oxidación (Simitzis, *et al.*, 2013).

Sin embargo, aunque la pulpa de naranja tiene se ha evaluado por sus propiedades antioxidantes, las investigaciones realizadas no abordan el aspecto de la biodisponibilidad

fenólica y en la proporción de estos compuestos que son liberados en la circulación para el metabolismo en los tejidos cuando se ingiere como componentes de la dieta de los animales, incluyendo los seres humanos (Rodríguez-Roque *et al.*, 2011; Luciano 2017). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento productivo de corderos alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja y su efecto en la oxidación de lípidos de la carne.

Materiales y métodos

Localización

El ensayo se realizó en la unidad metabólica y en el Laboratorio de Nutrición Animal, pertenecientes al Posgrado de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Animales

La prueba de crecimiento se realizó en un periodo de 75 días: 15 de adaptación, y 60 de finalización. Se utilizaron 32 corderos machos de la raza Hampshire, con un peso vivo inicial de 25 ± 1 kg, los cuales se desparasitaron (Closantil[®] 5%; 1 mL 5 kg^{-1} PV e Ivomec[®] 1%; 1 mL 50 kg^{-1} PV), vacunaron (Bobact[®] 8; 2.5 mL animal^{-1}) y se distribuyeron en cuatro tratamientos usando un diseño completamente al azar, con ocho repeticiones. Los animales se alojaron en jaulas metabólicas individuales acondicionadas con comedero y bebedero, y el alimento se ofreció a razón de 5 % del peso vivo, aportado dos veces al día (8:00 y 16:00 h), y el agua se ofreció *ad libitum*. Los corderos fueron manejados de acuerdo al Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados (CP, 2016).

Variables productivas

Se evaluó el consumo de materia seca (CMS; g d⁻¹) mediante el pesaje del alimento ofrecido menos el rechazado. La ganancia diaria de peso (GDP) se calculó mediante el pesaje de los animales al inicio del experimento y posteriormente cada 15 días antes de ofrecer el alimento. La conversión alimenticia se estimó como la relación entre CMS y GDP.

Dietas y determinación de hesperidina

La inclusión de pulpa de naranja deshidratada (PND) en las dietas se estableció de acuerdo al contenido de hesperidina (Hes) con niveles de 0, 1500, 3000 y 4500 mg Hes kg⁻¹ MS, para el T1, T2, T3 y T4, respectivamente. La composición química de las dietas experimentales y los tratamientos evaluados se presentan en el Cuadro 1.

La extracción de hesperidina se realizó de acuerdo al método propuesto por Chang *et al.* (2002), se pesaron 250 mg de muestra y se colocaron en tubos Eppendorf (2.0 mL), añadiendo 1 mL de metanol (MeOH) al 80% e incubaron en baño maría a 40°C por 1 h, después se centrifugaron a 5031 x g durante 10 min. Se transfirieron 500 µL del sobrenadante en tubos Eppendorf (2.0 mL) y se inyectaron 15 µL en un cromatógrafo de líquidos (HPLC System, Agilent Hewlett Packard mod 1100, USA).

Caracterización química de las dietas

Durante la prueba metabólica se recolectaron muestras de cada una de las dietas experimentales y se elaboraron muestras compuestas por periodo para determinar el contenido de materia seca (MS), proteína cruda (PC), cenizas (CEN) y extracto etéreo (EE) (AOAC, 2005), y fibra detergente neutro (FDN) (Van Soets *et al.*, 1991).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados y composición química de las dietas experimentales

	Tratamientos* (T)			
	T1	T2	T3	T4
Ingredientes %				
Pulpa de cítrico deshidratada	0	13	26	39
Maíz quebrado	46	45.5	31.5	17.5
Pasta de soya	23	23.5	24.5	25.5
Paja de avena	25	14	14	14
Melaza	5	3	3	3
Premezcla mineral	1	1	1	1
Composición química ¹				
Energía Metabolizable, Mcal kg ⁻¹	2.77	2.89	2.86	2.83
Proteína cruda, %	17.29	17.17	17.11	17.05
Extracto etéreo	2.94	3.14	3.05	2.93
Fibra Detergente Neutro, %	23.31	19.56	21.59	23.63

Hes= Hesperidina; T1, T2, T3 y T4 con 0, 1500, 3000 y 4500 mg Hes kg⁻¹ MS, respectivamente.

Extracción de fenoles y flavonoides totales

El procedimiento de extracción de fenoles y flavonoides totales se realizó según la técnica descrita por Chun *et al.* (2003) y Franke *et al.* (2004).

Determinación de Fenoles totales

La determinación de fenoles totales (FeT) de la PND se realizó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu según la técnica descrita por Singleton y Rossi (1965). Se registró la lectura de la absorbancia a 685 nm en un espectrofotómetro (CARY 1-E Varian, USA) y la concentración de FeT se calculó con respecto a la curva estándar de ácido gálico (0 a 12 mg mL⁻¹). Los resultados se expresaron en miligramo de ácido gálico por gramo MS de PN.

Determinación de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales (FIT) se obtuvo por el método colorimétrico descrito por Zhishen *et al.* (1999). Se registró la lectura de la absorbancia a 370 nm en un espectrofotómetro (CARY 1-E Varian, USA) y la concentración de FIT se calculó con respecto a la curva estándar de hesperidina (50 a 200 mg mL⁻¹). Los resultados se expresaron en miligramos de hesperidina por gramo MS de PN.

Oxidación de lípidos en carne

La oxidación de lípidos se evaluó mediante la medición de sustancias reactivas al ácido 2 tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito por Siu y Draper (1978), y se evaluaron a los 1, 7, 14 y 21 d. Muestras de carne de 2.5 g se homogeneizaron con 12.5 mL de agua destilada, durante la homogenización, las muestras se colocaron en un baño maría, posteriormente, se adicionaron 12.5 mL de ácido tricloroacético para precipitar las proteínas y se agito en vórtex. Los homogenizados se filtraron (papel de filtro Whatman No. 1) y del filtrado se tomaron 4 mL, se colocaron en tubos de vidrio Pyrex y se mezclaron con 1 mL de

ácido tiobarbitúrico, posteriormente se incubaron en baño maría a 80 °C durante 90 min, y finalmente se leyó la absorbancia de cada muestra a 532 nm en un espectrofotómetro (CARY 1-E Varian, USA). El ensayo se calibró con una solución de concentración conocida de TEP (1, 1, 3, 3, -tetraethoxypropane). Los resultados se expresaron como miligramos de malonaldehído (MDA) por kilogramo de carne.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con un diseño completamente al azar mediante el procedimiento PROC GLM de SAS (2013) utilizando como covariable el peso vivo inicial para las variables consumo de materia seca (CMS), ganancia diaria de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey (Steel et al, 1997).

Resultados y discusión

Variables productivas

El reemplazo parcial de maíz por inclusión de contenidos crecientes de pulpa de naranja (PN) en la dieta de corderos no afectó ($P > 0.05$; Cuadro 2) la ganancia diaria de peso (GDP), el consumo de MS (CMS) y la conversión alimenticia (CA) entre los tratamientos evaluados, observándose valores promedio de GDP de 265 g d⁻¹. Los resultados en el presente estudio son superiores 265 g d⁻¹ a los reportados en la literatura, donde se mencionan GDP entre 210 y 222 g d⁻¹ al incluir contenidos de 23 a 68 % de PN en la dieta (Rodríguez *et al.*, 2008; Polizel *et al.*, 2016). En contraste, Caparra *et al.* (2007) y Lanza *et al.* (2015) reportaron GDP inferiores a las del presente estudio, con valores de 178 y 177 g d⁻¹ al incluir entre 24 y 45% de PND en la dieta de corderos. Los resultados de este estudio demuestran la factibilidad de sustituir maíz por PN hasta 39 % en la dieta de corderos en finalización, sin afectar las variables productivas. No obstante, la respuesta productiva de corderos se afecta

negativamente con contenidos de 66 % PN en la dieta, porque se afecta la absorción de Ca, P y Mg y genera trastornos metabólicos cuando utiliza de forma prolongada (Bueno *et al.*, 2002). Por lo anterior, el uso de contenidos moderados de la PND (39 %, T4) puede tener una aplicación valiosa en la alimentación de rumiantes, como alternativa para reducir el uso de cereales, los cuales constituyen el ingrediente principal y más costoso de la dieta en sistemas intensivos (Olivera *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Comportamiento productivo de corderos alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja en la dieta

Variables	T1	T2	T3	T4	EEM*
Peso inicial, kg	25.62	26.26	25.39	25.79	3.87
Peso final, kg	40.79	42.89	40.91	42.33	3.57
GDP, g d ⁻¹	252	277	258	275	0.059
CMS, g d ⁻¹	1330	1320	1250	1260	0.123
CA	5.38	4.87	5.03	4.66	0.630

T1, T2, T3 y T4 con 0, 13, 26 y 39% de PND, respectivamente. GDP= Ganancia diaria de peso; CMS= Consumo de materia seca; CA= Conversión alimenticia; EEM*= Error estándar de la media; ^{a, b, c} Valores con distinta literal en hilera indican diferencias (P<0.05).

Fenoles y flavonoides totales en carne

La concentración de fenoles totales (FeT) en carne fue mayor (P<0.05; Cuadro 4) en el T3 y T4 en los períodos 1, 7 y 14 d, observándose que a los 21 ya no existió diferencia (P<0.05) entre tratamientos para esta variable. La concentración de flavonoides totales (FIT), mostró su máxima concentración en carne de corderos del grupo T3 y T4 los días 7, 14 y 21, en forma general, las máximas concentraciones de Fet y FIT observadas en carne de corderos

del T3 y T4 se relacionaron con contenidos de inclusión más altos de pulpa de naranja en la dieta.

Cuadro 3. Fenoles y flavonoides totales en la carne de corderos alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja durante la vida de anaquel

Periodo , d	Tratamientos				EEM*
	T1	T2	T3	T4	
Fenoles totales	----- mg AG g ⁻¹ MS-----				
1	0.72 ^b	0.74 ^b	0.75 ^{ba}	0.80 ^a	0.012
7	0.67 ^b	0.70 ^b	0.81 ^{ba}	1.00 ^a	0.061
14	0.77 ^c	0.84 ^{bc}	0.98 ^{ba}	1.03 ^a	0.033
21	1.30	1.31	1.36	1.39	0.028
Flavonoides	----- mg Hes g ⁻¹ MS -----				
1	0.93	1.04	1.06	1.08	0.036
7	1.18 ^b	1.25 ^b	1.52 ^a	1.60 ^a	0.028
14	0.95 ^c	1.42 ^b	1.76 ^a	1.87 ^a	0.029
21	1.96 ^c	3.08 ^b	4.00 ^a	4.05 ^a	0.077

T1, T2, T3 y T4 con 0, 13, 26 y 39% de PN, respectivamente. AG= Ácido gálico; Hes= Hesperidina; ^{a, b, c} Valores con distinta literal en hilera indican diferencias (P<0.05).

Los resultados de este estudio demuestran el aumento en la biodisponibilidad de Fet y FIT de la pulpa de naranja (PN) en función del incremento en la inclusión de ésta en la dieta de corderos. Estudios anteriores señalan la capacidad de los flavonoides para atravesar las membranas microsomales del hígado (Van Acker *et al.*, 2000) y de esta manera los grupos hidróxido fenólicos actúan como donantes de hidrógeno a los radicales peróxidos, producidos

en la oxidación de lípidos, retardando así la formación de peróxido hidroxilo, lo cual actúan eliminando radicales libres en los sistemas *in vivo* en defensa de antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa (Yanishlieva-Maslarova, 2001). Así mismo, adicionar pulpa de naranja en la dieta del animal o directamente en la carne, es una estrategia simple y conveniente para introducir de manera uniforme antioxidantes naturales en los fosfolípidos de las membranas, donde puede inhibir eficazmente reacciones oxidativas en sus sitios localizados (Lauridsen *et al.*, 1997). Los resultados del presente estudio, destacan la importancia del aporte a nivel de tejido de compuestos bioactivos con potencial de ejercer el efecto antioxidante, en aquellos corderos que recibieron los contenidos más altos de PN en la dieta (T3 y T4).

Algunos de los compuestos fenólicos presentes en los cítricos han demostrado ser biodisponible en rumiantes; así lo demostraron Gladine *et al.* (2007) después de administrar un extracto de cítricos en la dieta de ovejas y detectar naringenina en plasma y fue capaz de aumentar su resistencia a la peroxidación de lípidos. Por lo tanto, nuestros resultados están de acuerdo a diversos estudios que informaron un aporte mayor de compuestos bioactivos para mejora de estabilidad oxidativa de la carne en respuesta a la administración de las dietas con PN al contener FeT y FIT (Gravador *et al.*, 2014; Inserra *et al.*, 2014).

Oxidación de lípidos en carne

La oxidación de lípidos, expresada como la concentración de malondialdehído, fue superior ($P < 0.05$; Cuadro 3) en la carne de corderos del grupo T1 y T2, donde se incluyeron los contenidos más bajos de PN (0 y 13 % para T1 y T2, respectivamente) durante la vida de anaquel evaluada; por el contrario, la carne de corderos que recibieron los contenidos más altos de PN en la dieta (T3 y T4) presentaron los índices más bajos ($P < 0.05$) de oxidación de

lípidos en los períodos evaluados e indica que la incorporación de la pulpa de naranja en las dietas en los de cordero T3 y T4 retraso la oxidación de lípidos desde el día 1 y hasta los 21 días en anaquel.

Cuadro 4. Oxidación de lípidos en carne de corderos alimentados con contenidos crecientes de pulpa de naranja durante la vida de anaquel

Tratamientos					
Día	T1	T2	T3	T4	EEM*
		----- mg MDA kg ⁻¹ MS -----			
1	1.52 ^a	0.840 ^b	0.585 ^c	0.452 ^d	0.031
7	4.11 ^a	3.90 ^a	1.65 ^b	1.00 ^b	0.390
14	5.36 ^a	4.90 ^a	3.26 ^b	2.26 ^b	0.356
21	7.10 ^a	5.72 ^a	3.48 ^b	2.99 ^b	0.432

T1, T2, T3 y T4 con 0, 13, 26 y 39% de PN, respectivamente. MDA= Malondialdehído
EEM*= Error estándar de la media. ; ^{a, b, c} Valores con distinta literal indican diferencias (P<0.05).

El deterioro oxidativo de la carne inicia en la fracción de los ácidos grasos insaturados presentes en los fosfolípidos de la membrana, lo que lleva a la producción de hidroperóxidos susceptibles a la oxidación de productos de reacciones secundarias como son aldehídos de cadena corta, cetonas y otros compuestos oxigenados que pueden causar rancidez y limitación de la vida útil de la carne (Kanner, 1994) y es aquí donde los compuestos bioactivos de la PN actúan eliminando radicales libres y reduciendo la oxidación (Yanishlieva-Maslarova, 2001) como ocurrió en la carne de los corderos en el grupo T3 y T4.

En este sentido, la oxidación lipídica depende del equilibrio de los componentes químicos presentes, oligoelementos quelantes de hierro o antioxidantes (Ponnampalam *et al.*, 2017). En este entendido, el mecanismo principal de los Fet y FIT de la PN es la neutralización de radicales libres para reducir el deterioro de la calidad en alimentos y especialmente en los productos cárnicos (Kanner, 1994) y resulta congruente con los resultados de este estudio al observarse mayor actividad antioxidante al incrementar los niveles de PND en la dieta; no obstante, esta capacidad antioxidante se vio disminuida con el tiempo, al detectarse que del día 1 al 21, la concentración de malondialdehído se fue incrementando aún en los tratamientos que incluyeron los contenidos más altos de PN en la dieta (T3 y T4).

Niveles de 4.2 a 7.5 mg MDA kg⁻¹ MS en músculo se han relacionado con carnes rancias (Berruga *et al.*, 2005) y congruente con esto, la carne de corderos de los grupos T1 y T2, ya presentaban oxidación desde el día 7; sin embargo, los valores de MAD observados en el T3 y T4 a los 21 días muestran ausencia de rancidez en las carnes de corderos suplementados con los niveles más altos de PN y resulta congruente con lo reportado por Inserra *et al.* (2014), quienes determinaron en promedio 0.64 mg MDA kg⁻¹ al incluir 24 y 35 % PN a 6 días de anaquel. Resulta de importancia destacar que una mayor ingesta de antioxidantes naturales en la dieta contribuirá a una mayor biodisponibilidad de compuestos bioactivos en el músculo y ejercerá mejoras al evitar el deterioro oxidativo de la carne (Descalzo y Sancho, 2008; Gravador *et al.*, 2014).

Conclusiones

Se concluye que los contenidos de inclusión de pulpa de naranja en la dieta de corderos evaluados en este estudio favorecen la sustitución de maíz sin afectar las respuesta productiva de los corderos; además, el nivel de inclusión de 39 % de pulpa de naranja en la dieta mejoró el aporte de fenoles y flavonoides en el tejido muscular para reducir la oxidación de lípidos en carne durante la vida de anaquel.

Literatura citada

- Abeyasinghe, D. C., Li, X., Sun, C. D., Zhang, W., Zhou, C., & Chen, K. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chem.* 104:1338-1344.
- Abreu, F. B. A. 2016. Effect of edible and active coating (with Rosemary and oregano essential oils) on beef characteristics and consumer acceptability. *PloS One.* 11(8):160-531.
- Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Brody, A. L., Li, Z., Qazi, I. M., Pavase, T. R., Liangtao, L. 2017. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control.* 82:163-178.
- Alparslan, Y., & Baygar, T. 2017. Effect of chitosan film coating combined with orange peel essential oil on the shelf life of Deepwater pink shrimp. *Food Bioprocess Technol.* 10(5):842-853.

- Berruga, M. I., Vergara, H., & Gallego, L. 2005. Influence of packaging conditions on microbial and lipid oxidation in lamb meat. *Small Rum. Res.* 57:257-264.
- Bueno, M. S., Ferrari, E., Blanchini, D., Leinz, F. C., & Rodríguez, F. 2002. Effect of replacing corn with dehydrated citrus pulp in diets of growing kids. *Small Rum. Res.* 46:179-185.
- Campo, M. M., Nute, G. R., Hughes, S. I., Enser, M., Wood, J.D., & Richardson, R. I. 2006. Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Sci.* 72:303-311.
- Caparra, P., Foti, F., Scerra, M., Sinatra, M. C., & Scerra, V. 2007. Solar-dried citrus pulp as an alternative energy source in lamb diets: Effects on growth and carcass and meat quality. *Small Rum. Res.* 68:303-311.
- Chang, C., Yang, H. Wen and J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis.* 10:178-182.
- Chun, O. K., Kim, D. O., Moon, H. Y., Kang, H. G., & Lee, C. Y. 2003. Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *J Agricultural Food Chem.* 51:7240-7245.
- Contini, C., Katsikogianni, M. G., O'Neill, F. Y., O'Sullivan, M., Dowling, D. P., & Monahan, F. J. 2012. PET trays coated with citrus extract exhibit antioxidant activity with cooked turkey meat. *Food Sci. Technol.* 47:471-477.
- CP. 2016. Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. Consejo general académico. ACUERDO 02.11.16.

- Polizel, D. M., Gobato, L. G. M., de Souza, R. A., Gentil, R. S., Ferreira, E. M and Freire, A. P. A. 2016. Performance and carcass traits of goat kids fed high-concentrate diets containing citrus pulp or soybean hulls/Desempenho e características da carcaca de caprinos alimentados com dietas de alto teor de concentrado, contendo polpa cítrica ou casca de soja. *Ciencia Rural*. 46:707-712.
- Descalzo, A. M., & Sancho, A. M. 2008. A review of natural antioxidant and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Sci*. 79: 423-436.
- Ponnampalama, E. N., Plozza T., Kerr M. G., Lindena, N., Mitchell M., Bekhit, A. ED. A., Jacobs J, L., Hopkins, D. L. 2017. Interaction of diet and long ageing period on lipid oxidation and color stability of lamb meat. *Meat Sci*. 129:43-49.
- Escobedo-Avellaneda, Z., Gutiérrez-Urbe, J., Valdez-Fragoso, A., Torres, J. A., Welti-Chanes, J. 2014. Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. *J. Funtional Foods*. 6:470-481.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Arakaki, C., & Murphy, S. P. 2004. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *J. Food Composition Analysis*. 17:1-35.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., Singla A. K. 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Res*. 15:655-669.

- Gladine, C., Rock, E., Morand, C., Bauchart, D., & Durand, D. 2007. Bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. *British J. Nut.* 98:691-701.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., & Gomez-Guillen, M. C. 2014. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle proteins as source to develop edible films. *Food Hydrocolloids.* 41:86-94.
- Gravador, R. S., Jongberg S., Andersen, M. L., Luciano, G., Priolo, A and Lund M. N. 2014. Dietary citrus pulp improves protein stability in lamb meat stored under aerobic conditions. *Meat Sci.* 97:231-236.
- Rodrigues, G. H., Susin, I., Pires, A. V., Mendes, C. Q., de Araujo R. C and Packer, I. U. 2008. Substituicao do milho por polpa citrica em racoes com alta proporcao de concentrado para cordeiros confinados. *Ciencia Rural.* 38:789-794.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Ghavi, F. F. 2016. Effect of fish gelatin coating enriched with oregano essential oil on the quality of refrigerated rainbow trout fillet. *J. Aquatic Food Product Technol.* 25(6):835-842.
- Insera, L., Priolo, A., Biondi, L., Lanza, M., Bognanno M., Gravador, R., Luciano, G. 2014. Dietary citrus pulp reduces lipid oxidation in lamb meat. *Meat Sci.* 96:1489-1493.
- Kanner, J. 1994. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Sci.* 36:169-189.
- Karpińska-Tymoszczyk, M. 2014. The effect of antioxidants, packaging type and frozen storage time on the quality of cooked turkey meatballs. *Food Chem.* 148:276-83.

- Lagha-Benamrouche, S., Khodir Madani. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria:Peels and leaves. *Industrial Crops Products*. 50:723-730.
- Lauridsen, C., Buckley, D. J., Morrissey, P. A. 1997. Influence of dietary fat and vitamin E supplementation on α -tocopherol levels and fatty acid profiles in chicken muscle membranal fractions and on susceptibility to lipid peroxidation. *Meat Sci*. 46:9-22.
- Luciano, G., Roscini, V., Mattioli, S., Ruggeri, S., Gravador, R. S., Natalello, A., Lanza, M., De Angelis A., and Priolo A. 2017. Vitamin E is the major contributor to the antioxidant capacity in lambs fed whole dried citrus pulp. *Animal*. 11:411-417.
- Lanza, M., Scerra, M., Bognanno, M., Buccioni, A., Cilione, C., Biondi, L., Priolo, A and Luciano G. 2015. Fatty acid metabolism in lambs fed citrus pulp. *J. Anim. Sci*. 93:3179-3188.
- Oliveira, A. M., Alves, P. S., Santos-Silva, J., Bessa, J. B. R. 2017. Effect of dietary starch level and its rumen degradability on lamb meat fatty acid composition. *Meat Sci*. 123:166-172.
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdon, E., Bahorun, T. 2011. Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Res. International*. 44:2088-2099.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. Saura-Calixto, F. 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: A nonessential physiological function. *J. Agric. Food Chem*. 59:43-49.

- SAGARPA, 2017. http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/enero/Documents/JAC_0015-10.PDF. Consultado el 21 de junio del 2017.
- SAS. Institute Inc. 2013. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC.
- Shah, M. A., Bosco, J. S. D., & Mir, S. A. 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci.* 98:21-33.
- Simitzis, P. E., Ilias-Dimopoulos, V., Charismiadou, M. A., Biniari, E. E., Deligeorgis, S. G. 2014. The effects of dietary hesperidin supplementation on lamb performance and meat characteristics. *J. Anim. Sci.* 84:136-143.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American J. Enology Viticulture.* 16:144-153.
- Siu, G. M., & Draper, H. H. 1978. A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. *J. Anim. Sci.* 43:1147-1149.
- Steel, G. R., Torrie J. H. 1986. *Bioestadística: Principios y Procedimientos.* 2nd Edition. McGraw-Hill, México. 167-171 p.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. 2007. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chem.* 104:466-479.
- Van Acker, F. A. A., Schouten, O., Haenen, G. R. M. M., Van Der, V., Bast A. 2000. Flavonoids can replace α -tocopherol as an antioxidant. *FEBS Letters.* 473:145-148.

Van Soest, P. J. 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. O & B Books, Inc., U.S.A. 374 p.

Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M., & Priolo, A. 2008. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. Review. Anim. Feed Sci. Technol. 147:223-246.

Yanishlieva-Maslarova, N. V. 2001. Inhibiting oxidation. In: Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (eds), Antioxidants in Food, Practical applications. Pp. 22-70. Woodhead Publishing Limited, CRC Press, Cambridge, England.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents of mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64:555-559.

CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los resultados de este estudio se concluye que el nivel de inclusión de 20 y 52 % de PND propició las mejores condiciones de fermentación ruminal *in vitro* e *in situ* respectivamente, asociándose a la mayor degradación de la MS. La inclusión de 52.5 % de PND favorece el mejor aporte de fenoles y flavonoides totales en duodeno, bioaccesibles para ejercer efecto antioxidantes.

La inclusión de niveles de pulpa de naranja en la dieta de corderos evaluados en este estudio favorecen el reemplazo de maíz sin afectar las respuesta productiva del animal; además, el nivel de inclusión de 39 % de pulpa de naranja en la dieta mejoró el aporte de fenoles y flavonoides a nivel de tejido muscular para reducir la oxidación de lípidos en carne durante la vida de anaquel.