





NAIESTRÍA E V RODUKOCIÓN MIÑMAN







# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA "BENITO JUÁREZ" DE OAXACA

# FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

"ESTADO OXIDATIVO, FERMENTACIÓN Y COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL DE DESECHO DE NARANJA FRESCA, DESHIDRATADA Y ENSILADA"

# TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

# PRESENTA: MVZ. BENITO IRVING GUZMÁN JIMÉNEZ

**DIRECTOR:** 

DR. TEODULO SALINAS RIOS

**CO-DIRECTOR:** 

D. Ph. JORGE HERNÁNDEZ BAUTISTA

OAXACA DE JUÁREZ OAXACA, SEPTIEMBRE DE 2020.



Estado Oxidativo, Fermentación y Composición Nutrimental de Desecho de Naranja Fresca, Deshidratada y Ensilada Tesis presentada por el MVZ Benito Irving Guzmán Jiménez como requisito para obtener el Grado de Maestro en Producción Animal, ha sido aprobada y aceptada por:



M en C. Patricia Karina Vicente Castillo Directora de la Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia

M. en MVZ. Magaly Aquino Cleto Coordinadora de Posgrado e Investigación

M en C. Jorge Morín Rubio Responsable de la Maestría en Producción Animal

Dr. Teodulo Salinas Rios Director de Tesis

D. Ph. Jorge Hernández Bautista Co- Director de Tesis

# Septiembre 2020

Fecha

Jurado:

Dr. Teodulo Salinas Rios

D. Ph. Jorge Hernández Bautista

M en C. Cuauhtémoc Nava Cuellar

M en C. Jorge Morín Rubio





#### FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



FEP-3

M en MVZ MAGALY AQUINO CLETO COORDINADORA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN PRESENTE.

Los integrantes del Jurado para Examen de Grado de Maestro en Producción Animal hemos revisado el trabajo de investigación del MVZ. BENITO IRVING GUZMÁN JIMÉNEZ, titulado "Estado oxidativo, fermentación y composición nutricional de desechos de naranja fresca, deshidratada y ensilada".

Damos nuestro voto de aprobación para los fines y trámites correspondientes.

Oaxaca de Juárez, Oax., a 18 de septiembre de 2020.

#### ATENTAMENTE

"CIENCIA, ARTE, LIBERTAD"

Presidente Dr. Teodulo Salinas Rios

Secretario Dr. Jorge Hernández Bautista

Sinodal M en C. Cuauhtémoc Nava Cuellar Suplente M en C. Jorge Morin Rubio



#### **Dedicatoria**

Mi tesis se la dedico con todo amor y cariño.

#### A Dios

Quien me dio vida y la oportunidad de concluir este trabajo.

#### A mis Padres...

Eugenia Jiménez Hernández y José Benito Guzmán García como una muestra de admiración, amor y respeto, porque muy a su manera me enseñaron a ser fuerte y decidido en todo lo que realizo.

#### A mi Hermano...

Daniel gracias por los buenos deseos que siempre has tenido para mí, pero esencialmente por la confianza, el cariño y el amor que nos une.

#### A mi novia...

Lupita que me ha apoyado moral, emocional e incondicionalmente durante la maestría.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por permitir culminar un ciclo más en mi vida profesional y darme la oportunidad de llegar hasta este punto.

A la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por nuestro desarrollo profesional.

Al **Dr. Teódulo Salinas Ríos** Director y Asesor de este proyecto, por todo el conocimiento compartido y su paciencia para poder terminar esta tesis.

A mis asesores D. Ph. Jorge Hernández Bautista y D. Ph. Amós Palacios Ortiz por su gran amistad y paciencia, gracias a su constante apoyo y comprensión se pudo realizar este trabajo de investigación.

Al M en C. Cuauhtémoc Nava Cuellar por su tiempo, paciencia y conocimientos compartidos durante mi estancia en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

Al M. en C. Rubén San Miguel Chávez, investigador en el área de Fitoquímica del Colegio de Posgraduados, por ayudarme a realizar parte de la investigación.

Al Dr. Héctor Maximino Rodríguez Magadán por el apoyo al realizar este proyecto.

A los MVZ. Fabián, Jesús y Eleazar por su amistad brindada durante la maestría, como olvidar de esos viajes de práctica que fueron espectaculares, éxito amigos.

Al M. en C. Gil Aragón Peralta y a la MVZ Janeth Antonio Hernández por la amistad y conocimiento compartido en el Laboratorio de Nutrición Animal de la FMVZ, UABJO.

A los doctores, maestros, compañeros de la licenciatura por su amistad durante este proceso de aprendizaje.

# **CONTENIDO**

	Pág.
Dedicatoria	١٧
Agradecimientos	V
Contenido	VI
Índice de cuadros	VIII
Índice de figuras	IX
1RESUMEN	1
2INTRODUCCIÓN	2
3REVISIÒN DE LITERATURA	5
3.1 Origen de la Naranja	5
3.2 Anatomía de la Naranja	2 5 5 6 9 9
3.3 Composición química de la naranja	6
3.4 Antioxidantes	9
3.5 Clasificación de Antioxidantes	9
3.5.1 Naturales	
3.5.2 Sintéticos	10
3.5.3 Enzimáticos	10
3.5.4 No Enzimáticos	11
3.6 Ensilado	12
3.6.1 Factores que afectan el proceso y calidad de ensilaje	15
3.7 Análisis de las fracciones de fibra por el método de Van Soest	16
3.7.1 Fibra Detergente Neutra	16
3.7.2 Fibra Detergente Acida	17
3.8 Ácidos Fenólicos	17
3.9 Flavonoides	19
3.10 Inclusión de la naranja en alimentación animal	21
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
5 HIPÓTESIS	24
6 OBJETIVO	25
6.1 Objetivo General	25
6.2 Objetivos Específicos	25
7 JUSTIFICACIÓN 8 MATERIAL Y MÉTODOS	26 27
	27 27
<ul><li>8.1 Descripción del área donde se realizó el estudio.</li><li>8.2 Periodo de estudio</li></ul>	28
8.3 Tratamientos	28
8.3.1 Fresco	20 29
	29
8.3.2 Ensilado de desecho de naranja	31
8.3.3 Deshidratado de desecho de naranja 8.4 Medición de pH	31
8.5 Extracción de ácido láctico	34
8.6 Proteína cruda	3 <del>4</del> 36
8.7 Determinación de fibra detergente ácida	39
8.8 Determinación de fibra detergente acida  8.8 Determinación de fibra detergente neutra	42
8.9 Determinación de flavonoides y fenólicos	45
O.O. POLOHIHIADIDH AO HAYDHUIDDO Y IDIIDIDDO	

8.10 Extracción de antioxidantes para determinación de capaci-	48
dad antioxidante	
8.11 Determinación de ácido ascórbico	52
8.12Análisis estadístico	55
9RESULTADOS y DISCUSIÓN	56
9.1 Materia Seca, FDA, FDN, y PC	56
9.2 Capacidad antioxidante y vitamina C	59
9.3 Indicadores de fermentación	63
9.4 Ácidos fenólicos	66
9.5 Ácidos flavonoides	70
10 CONCLUSIÓN	73
11 LITERATURA CITADA	74

# Índice de cuadros

Cuadro		Pág.
1	Contenido promedio de nutrimentos y energía en el fruto de naranja (por 100 g de producto).	7
2	Composición nutrimental en base seca, del bagazo de naranja deshidratado (g/100g de materia seca).	8
3	Promedios de materia seca, FDA, FDN, y PC en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo.	58
4	Promedios de indicadores de capacidad antioxidante y vitamina C en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo	62
5	Promedios de indicadores de fermentación en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo	65
6a	Promedios de ácidos fenólicos en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo	68
6b	Continuación de promedios ácidos fenólicos en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo	69
7	Promedios de ácidos flavonoides en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo	72

# Índice de figuras

Figura		Pag.			
1	Anatomía de un fruto de naranja.	6			
2	Estructura básica de los flavonoides. Anillos aromáticos (A y B), heterociclo oxigenado (C).	20			
3	Macro localización de la FMVZ – UABJO.	27			
4	Pesaje de muestra fresca de desecho de naranja previo al tratamiento de congelación.				
5	Llenado y compactación de microsilos de desecho de naranja.	30			
6	Toma de muestra del microsilo de desecho de naranja.	30			
7	Almacenaje de los microsilos de desecho de naranja.	31			
8	Desecho de naranja en deshidratador solar.	31			
9	Pesaje de muestra de desecho de naranja para medir el pH.	33			
10	Filtrado de muestra de desecho de naranja licuada.	33			
11	Lectura de pH del extracto de desecho de naranja.	33			
12	Medición de extracto de ensilado de naranja para análisis de ácido láctico.	35			
13	Rotulación de tubo para guardar el extracto de ensilado de naranja.	35			
14	Pesaje de la muestra de desecho de naranja para análisis de proteína cruda.	38			
15	Muestra de desecho de naranja en el digestor del equipo FOSS.	38			
16	Destilación de muestra digerida con hidróxido de sodio (NaOH).	38			
17	Titulación de la muestra con ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).	38			
18	Pesaje de la muestra para análisis de fibra detergente ácida.	41			
19	Reflujo de la muestra en el digestor de fibra.	41			
20	Filtrado y enjuague de la muestra con agua destilada y acetona.	41			
21	Pesaje final de muestra en el papel Whatman.	41			
22	Añadiendo la solución neutra a la muestra de desecho de naranja.	44			
23	Reflujo de la muestra de desecho de naranja en el digestor.	44			
24	Filtrado y lavado de la muestra con agua destilada y acetona.	44			
25	Pesaje final de la muestra con papel Wathman.	44			
26	Pesaje de la muestra para obtener el extracto de desecho de naranja pasa su posterior análisis de cromatógrafo.	47			
27	Equipo cromatógrafo de líquidos Agilent MR modelo 1100 utilizado en el análisis de la muestra de desecho de naranja.	47			
28	Pesaje de la muestra para extracción de antioxidantes para la	50			

	determinación de capacidad antioxidante.	
29	Muestras en agitador orbital a temperatura ambiente para	50
	obtener el sobrenadante de desecho de naranja.	
30	Preparación de la muestra reacción (MR).	51
31	Adición de MR y muestra en viales para incubar.	51
32	Colocación de celdas en espectrofotómetro y lectura de las muestra.	51
33	Preparación del reactivo 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ).	51
34	Muestras de naranja en agitador orbital a temperatura ambiente.	53
35	Adición de ácido tricloroacético al extracto de las muestras de desecho de naranja.	53
36	Incubación del extracto de las muestras en agua fría.	54
37	Adición del reactivo Folin a los sobrenadantes de las muestras	54
	de desecho de naranja.	
38	Colocación y lectura de muestras en el espectrofotómetro.	54
39	Preparación de los tubos para estandarizar la curva.	54

1.- RESUMEN

El objetivo fue determinar la capacidad antioxidante y composición química del

desecho de naranja sometido a diferente método y tiempo de conservación. Los

tratamientos fueron: desechos de naranja ensilado a diferente tiempo (7, 14, 21, 28,

35, 42 y 49 días), deshidratado al sol y fresco, a los cuales se les realizó los análisis

de, MS, PC, FDN, FDA, pH, ácido láctico, capacidad antioxidante, vitamina C, ácidos

fenólicos y flavonoides. Se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas

mediante la prueba de Bartlett y de pruebas de normalidad con la prueba de Shapiro-

Wilk, cuando los datos no cumplieron con homogeneidad y normalidad de varianza

se realizaron transformaciones como "Log" y "sqrt"; Posteriormente se realizaron

análisis de varianza utilizando como efecto fijo el tratamiento. Se encontró que el

deshidratado incrementó la vitamina C y el porcentaje de proteína cruda

manteniéndose estables los demás valores, mientras que el ensilado incrementó la

capacidad antioxidante: la hespéridina, el siringico se mantienen en deshidratado, el

ácido clorogénico y el protocatecuico aumentan, los flavonoides no varian su

concentración en ningún tratamiento; el pH se estabilizan a partir del día 21 de

ensilado y el ácido láctico a partir del día 14.

Se concluye que existe variación en el estado oxidativo y composición nutricional

entre los tres métodos de conservación tanto mientras que el tiempo óptimo

recomendado de un ensilaje de desechos de naranja es a partir del día 28 que es

cuando existe una estabilización en el proceso.

Palabras clave: Citrus sinensis, antioxidantes, cáscara de naranja.

1

# 2.- INTRODUCCIÓN

La naranja pertenece al grupo frutal conocido como cítricos. Los dos países mayores productores de cítricos son China (23.32 %) y Brasil (13.31 %), mientras que USA, India, España y México, representan en conjunto el 35.6% del total mundial (FAO, 2017). En México se tiene sembradas 335,425.69 hectáreas; las principales entidades productoras de este cítrico son Veracruz, quien aporta el 44.5 % del volumen nacional; Tamaulipas el 14.6 % y San Luis Potosí, 8.8 %, dichos estados, en conjunto producen el 67.9 % del total cosechado en el país (SIAP, 2020).

La naranja tiene una elevada cantidad de ácido ascórbico o vitamina C (50 mg), energía (42 Kcal), el 0.8 % de proteína y 2 g de fibra por cada 100 g de porción comestible de naranja (FEN, 2011).

La pulpa de naranja contiene compuestos bioactivos, dentro de los cuales, los polifenoles, terpenos, carotenoides y ácido ascórbico exhiben propiedades antioxidantes (Abeysinghe *et al.*, 2007). En la producción animal, la aportación de vitamina C en la dieta resulta en una excelente fuente de electrones; por lo consiguiente puede disminuir la reactividad de los radicales libres (especies reactivas del oxígeno) con ello sus consecuencias negativas para el organismo (Campos-Granados, 2015).

Por otra parte, la suplementación con vitamina C mejora los componentes del sistema inmune, tales como macrófagos, células NK (asesinas naturales por sus siglas en Inglés), linfocitos, quimiotaxis y la hipersensibilidad de tipo retardado. Al mismo tiempo la vitamina C actúa contra efectos tóxicos, mutagénicos y

cancerígenos de los contaminantes ambientales, mediante la estimulación de las enzimas de desintoxicación del hígado; las deficiencias de los antioxidantes afectan a la formación de colágeno y de aminoácidos necesarios para la regeneración de los tejidos (McDowell, 2002).

Los desechos de naranja aportan sustratos energéticos debido al alto contenido de pectina (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; debido a la gran cantidad de desechos que se producen al extraerle el jugo, en ocasiones se genera un problema ambiental (Piquer *et al.*, 2009).

Un gran problema en la ganadería son los altos costos de los insumos destinados a la elaboración dietas, debido a ello se han utilizado los desechos de naranja para la alimentación de rumiantes, especialmente en épocas de escasez de forraje (Hernández et al., 2012); sin embargo, la producción de naranja es estacional y por lo tanto el desecho de naranja también, por lo que es necesario la aplicación de métodos de conservación que permitan disponer del insumo durante todo el año. Ciertos métodos de conservación producen pérdidas de nutrimentos y de antioxidantes, por lo cual es necesario encontrar el tiempo óptimo de ensilaje y el mejor método de conservación donde no se altere la composición química y de antioxidantes de los desechos de naranja (Pedraza et al., 2006).

La finalidad de este estudio es aportar conocimientos que enriquezcan el conocimiento actual sobre el estado oxidativo y valor nutricional de los desechos de naranja sometido a diferentes métodos y periodos de conservación, y así poder

determinar cuál es la mejor opción. Al aprovechar los desechos de naranja se reducirán los costos de alimentación en animales de producción.

# 3. REVISIÓN DE LITERATURA

## 3.1 Origen de la Naranja

Uno de los cultivos cítricos más importantes a nivel mundial es la naranja, cuyo origen es el sureste del continente asiático y particularmente a China, Filipinas e India. De Asia pasó a Europa y fue traído a América por los españoles (INIFAP, 2009).

El significado de "naranja" se asocia a las características propias de este fruto. Uno de ellos derivado del latín y asociado a su color semejante al del oro es el de "Aurantia", otro de origen persa es el narang, "perfume interior" lo cual se relaciona con la presencia de aceites esenciales en este fruto (López, 2007).

La introducción de naranja en México, fue hace 500 años, inicialmente en el estado de Veracruz; la naranja ha sido llamada de diferentes maneras de acuerdo al lugar del cultivo y de la lengua indígena propia del lugar (INIFAP, 2009).

#### 3.2 Anatomía de la Naranja

La naranja es definida como el fruto redondo del naranjo que presenta por lo general una cáscara lisa de color verde, amarilla o naranja rojizo de olor agradable, pulpa jugosa, dividida en gajos y cuyo sabor va del dulce al ácido (NMX-FF-027-SCFI-2007).

La naranja presenta diferentes partes anatómicas cada una desempeña funciones diversas. A la vista se encuentra expuesta la cáscara que es de gran espesor y le proporciona protección (Figura 1) (López, 2007). La cáscara es conocida como "el pericarpio" o "flavedo", contiene en la región subdérmica, cromoplastos, que

confieren a la fruta una gran gama de colores que van desde el verde, amarillo o naranja, dependiendo del estado de madurez y numerosas glándulas rellenas de aceites esenciales aromáticos. En tanto que el interior llamada "mesocarpio" o "albedo", está formado por capas esponjosas de células parenquimatosas ricas en pectina. Por debajo del "albedo" envueltos en membranas fibrosas "septum", formando segmentos o gajos, se encuentra el "endocarpio" o "pulpa interna", que contiene el jugo y las semillas, constituyendo la parte pulposa de la naranja (Figura 1) (Mazza, 2000).

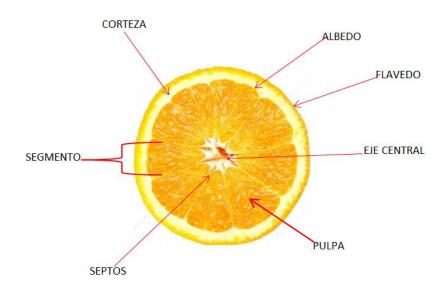


Figura 1: Anatomía de un fruto de naranja (Mazza, 2000).

# 3.3 Composición química de la naranja

La naranja contiene una amplia gama de compuestos, entre los cuales se pueden mencionar los volátiles (saborizantes), azúcares, enzimas, ácidos, proteínas, grasas, pigmentos y vitaminas, tal y como se muestra en el cuadro 1. En la naranja, al igual

que en la mayoría de los frutos cítricos, el agua es el componente principal, siendo el causante de su sabor refrescante característico (Fox y Camerón, 2002). El segundo aporte más importante en la naranja son los carbohidratos, cuyo representante principal son las sustancias pépticas, que forman parte integral de la pared celular y tienen como función unir y revestir los espacios intracelulares (Mazza, 2000).

Investigadores de la Fundación Española de la Nutrición ratificaron lo que Osborne y Voogt en 1986 descubrieron en la naranja, que contiene una amplia gama de vitaminas y minerales, de las primeras destaca la vitamina C (Cuadro 1), (FEN, 2011).

Sólo del 20 al 30 % del total de la vitamina C de la naranja se encuentra en el jugo, en tanto que más del 60 % se encuentra en la cáscara (flavedo y albedo); (Mazza, 2000).

**Cuadro 1**. Contenido medio de nutrientes y energía en el fruto de naranja (por 100 g de producto).

Macronutrientes		Minerales		Vitaminas	
Proteína Bruta	0.8 g	Ca	36 mg	A	150 U.I.
Grasa	0.1 g	Р	28 mg	Tiamina	0.1 mg
Carbohidratos Simples	9 g	Fe	0.3 mg	Riboflavina	0.03 mg
Fibra bruta	2 g	Na	3 mg	Niacina	0.4 mg
Energía	42 Kcal	K	200 mg	$B_6$	0.06mg
Agua	88.6 g			С	50 mg

Fuente: FEN, 2011.

Las proteínas y los lípidos en suma no representan más del 2 % del peso fresco total de la fruta. Rincón *et al.*, (2005) analizaron la composición química y compuestos bioactivos de la harina de cáscara de naranja y otros cítricos, encontrando que el porcentaje presente de proteína es de alrededor del 5%; sin embargo, González (2007) obtuvo un porcentaje por encima (15.14%) de lo antes mencionado (Cuadro 2), debido a las diversas fuentes de obtención de la harina (con o sin semilla), este último estudio utilizó desde la cáscara hasta las semillas, las cuales contienen de 10 a 12 % de proteína, por lo que eleva el porcentaje comparado con el estudio de Rincón *et al.* (2005).

Gonzáles (2007) determinó el contenido de fibra en la harina de bagazo de naranja, donde obtuvo un alto porcentaje de fibra soluble (59.84 %), y un porcentaje bajo de fibra insoluble (3.12 %) (Cuadro 2); concluyendo que el uso de harina de bagazo de naranja en la preparación de alimentos puede ser una buena fuente de fibra

**Cuadro 2.** Composición nutrimental en base seca, del bagazo de naranja deshidratado (g/100 g de materia seca).

Componente químico	Cantidad (g/100)		
Proteína	15.14		
Extracto etéreo	8.05		
Cenizas	3.7		
Carbohidratos	10.15		
Fibra soluble	59.84		
Fibra insoluble	3.12		

Fuente: González, 2007.

#### 3.4 Antioxidantes

Un antioxidante se define como una molécula capaz de retardar o prevenir el daño oxidativo de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos por especies reactivas del oxígeno, las cuales se generan por causas ambientales o por la ingesta de algún contaminante. Entre esas moléculas que remueven los radicales libres y que se encuentran naturalmente en los alimentos están la vitamina C, los compuestos fenólicos (flavonoides y antocianinas) y carotenoides (el β-caroteno, fuente de vitamina A) (Santander-M *et al.*, 2017). Las propiedades antioxidantes no solo deben estudiarse por sus interacciones químico-biológicas, sino por su función en el deterioro oxidativo que afecta a los alimentos (Pastene, 2009). Se utilizan en la industria alimentaria adicionados a las grasas u otros productos para retrasar los procesos de oxidación, en tanto previenen el comienzo de la rancidez oxidativa de las grasas (Llancari y Matos, 2011).

#### 3.5 Clasificación de antioxidantes

#### 3.5.1 Naturales

Se entiende normalmente por antioxidantes naturales ciertos productos presentes en vegetales y que con mayor o menor frecuencia ingerimos en la dieta; las frutas al ser una fuente de vitaminas y minerales, también son fuente rica en compuestos bioactivos conocidos como fotoquímicos, en este grupo se ubican los compuestos fenólicos que estando en bajas concentraciones en los alimentos, pueden prevenir ciertos procesos implicados en el desarrollo del cáncer y enfermedades cardiovasculares (Cruz et al., 2011). Los beneficios de una dieta rica en frutas y

verduras se deben a estos antioxidantes naturales. Comprenden a las vitaminas antioxidantes (C y E), los compuestos provitamina A, como carotenos y cripotoxantina, otros carotenoides como luteína, licopeno y zeaxantina, y varios compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides) (Valenzuela y Pérez, 2016).

#### 3.5.2 Sintéticos

Estos compuestos son antioxidantes fenólicos comerciales. Dentro de los antioxidantes sintéticos más usados en alimentos se encuentran el hidroxitolueno butilado (BHT), el hidroxianisol butilado (BHA), la butilhidroquinona terciaria (TBHQ) y los ésteres del ácido gálico, como el galato de propilo (Isaza *et al.*, 2013); fueron desarrollados en el área de alimentos a partir de la necesidad de obtener una protección más efectiva y, al mismo tiempo, más económico en relación a los antioxidantes naturales (Córdova *et al.*, 2010). Sin embargo, estos antioxidantes tienen la desventaja de que son volátiles y se descomponen fácilmente a altas temperaturas. Adicionalmente, los antioxidantes sintéticos han sido fuertemente cuestionados en torno a su seguridad y toxicidad (Isaza *et al.*, 2013).

#### 3.5.3 Enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos son los que el mismo organismo produce y que contrarrestan los efectos de los radicales libres en cierto grado. Un claro ejemplo de ellos es el glutatión, que se encuentra en el interior de la célula (citosol) (Ramírez et al., 2012). Las defensas antioxidantes son constituidas por mecanismos enzimáticos producidos naturalmente por el organismo con la función de protegerlo del estrés

oxidativo y evitar la reducción univalente del oxígeno (Hicks et al., 2006). Dentro de los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos, se encuentra la catalasa, enzima especializada en neutralizar el peróxido de hidrógeno, esta se encuentra en el interior de los glóbulos rojos y es capaz de transformar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en OH y agua (Davico et al., 2012). Superóxido dismutasa (SOD) que es una enzima intracelular distribuida en todo el organismo capaz de transformar el O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante la transformación de este en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido a su vez por la actividad de la catalasa o de la glutation peroxidasa (Mayor, 2010; Cruz et al., 2011). La glutation peroxidasa (GP) es una enzima que utiliza como cofactor al selenio, y que se ha encontrado en el citoplasma y las mitocondrias de los tejidos animales. Cataliza la reacción a través de la cual el glutatión reducido (GSH) reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol. Durante el proceso el glutatión es oxidado (GSSG), para posteriormente ser regresado a su estado original, por la enzima glutatión reductasa. 2GSH + H2O2 → GSSG + 2 H2O (González-Torres et al., 2010).

#### 3.5.4 No Enzimáticos

Estos constituyen un grupo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan los radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular, se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear, y en fluidos extracelulares (Córdova *et al.*, 2010). Los antioxidantes no enzimáticos se unen a los radicales libres y los transforman en radicales menos agresivos (Huerta *et al.*, 2005). Algunos antioxidantes no enzimáticos de las células son el glutatión que

tiene varios efectos en la defensa antioxidante celular, el ácido lipoico un antioxidante eficaz y sustituto eficaz del glutatión, las ubiquinonas (CoQ10) tienen efectos de gran utilidad como antioxidantes, los flavonoides, la vitamina E (alfa tocoferol) el cual elimina los radicales libres en membrana evitando la lipoperoxidación, la vitamina C (ácido ascórbico) tiene un efecto eliminador de radicales y recicla la vitamina E. Ambas vitaminas C y E trabajan como antioxidantes, los carotenoides son antioxidante de lípidos, acetil-L-carnitina, curcumina, N-acetilcisteína (NAC), resveratrol, selenio, vitamina B (López et al., 2012).

#### 3.6 Ensilado

El ensilaje es un método de fermentación anaeróbica, donde bacterias ácido lácticas (BAL) convierten los carbohidratos solubles, en ácidos orgánicos y agua; disminuyendo el pH para conservar el material (Gollop *et al.*, 2005).

El ensilaje pasa por seis fases (Driehuis y Oude, 2000):

#### 1.-Fase enzimática:

Después del corte, las enzimas del vegetal hidrolizan parte de las proteínas verdaderas, del almidón y de la hemicelulosa, causando pérdidas de distinto orden y generando azúcares que serán utilizados durante la fermentación láctica (Muck, 2013).

#### 2.- Fase aeróbica:

El oxígeno atrapado en la masa ensilada se reduce rápidamente por la actividad respiratoria del material vegetal y microorganismos aerobios facultativos (Duniére et al., 2013) .

#### 3.- Fase anaeróbica:

Al agotarse el O<sub>2</sub> este es reemplazado por CO<sub>2</sub> generando anaerobiosis así, los jugos celulares (azúcares) le sirven como fuente energética a las BAL.

#### 4.- Fase de fermentación o acidificación:

Se inicia cuando las BAL (homo y heterofermentadoras) dominan la fermentación, disminuyendo rápidamente el pH debido a la acumulación de ácido láctico y acético.

#### 5.- Fase de almacenamiento o estabilización:

El número de microorganismos viables disminuye (Driehuis y Oude, 2000) y se generan pocos cambios en el ensilaje (Driehuis y Oude, 2000; Dunière *et al.*, 2013).

#### 6.- Fase de deterioro aeróbico:

Inicia cuando el ensilaje queda expuesto al aire, provocando un período de oxidación de los ácidos orgánicos conservantes, incrementa el pH e inicia la proliferación de organismos anaeróbicos indeseables (levaduras ácido tolerantes) (Driehuis y Oude, 2000).

Los residuos agroindustriales cítricos pueden ser ensilados como alimentos para rumiantes sin ofrecer efectos negativos (Volanis *et al.*, 2004). Recientemente se han encontrado trabajos donde utilizan el ensilado de naranja, por ejemplo, Bermúdez-Loaiza *et al.*, 2015 y Melo-Camacho *et al.* (2017) evaluaron el ensilaje de naranja entera (*Citrus sinensis*) como alternativa de suplementación en rumiantes.

Los subproductos agroindustriales y los residuos de cosecha constituyen en los países agrícolas una fuente importante de alimento para la producción de leche y

carne, especialmente, en zonas donde los forrajes naturales son insuficientes (Martínez, 2008). En la conservación por ensilajes se trata de inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de la materia seca (Garcés *et al.*, 2006). Se puede lograr muy fácilmente el proceso de fermentación y ensilado del bagazo con mínimas pérdidas de material incluso sin taparlo con polietileno, aunque siempre es recomendable taparlo. Una manera sencilla y que permite minimizar las pérdidas es depositarlo sobre un polietileno de 200 micrones o más de espesor apoyado en el suelo, dejando suficiente plástico en los laterales para el posterior tapado del material, a fin de evitar el ingreso de aire. Esto se realiza en lugares altos con pendiente tal que permita la evacuación de los efluentes y desde el cual, una vez fermentado (luego de 15 o más días) se va sacando diariamente para alimentar a los animales (Fernández, 2015).

Filippi (2011) menciona las características que debe tener un buen ensilado.

- 1. Buen color verde oliva (aceituna) o café claro.
- 2. Buen olor (avinagrado)
- 3. Textura (no babosa)
- 4. pH de 4.2 o menor
- 5. Composición botánica del material ensilado

El tamaño de picado debe estar definido por varios factores, tales como, el uso eficiente de la maquinaria, facilidad de la compactación, aprovechamiento de la energía aportada por el grano, la movilidad ruminal y el correcto aprovechamiento del forraje en los comederos. Es por ello que se define como correcto, un picado

aproximado a los 1.5 cm, con el grano bien partido, que tenga entre un 7 y un 12 % de partículas de más de 2.5 cm pero nunca mayor a 8-10 cm (Cattani *et al.*, 2010).

En este método de preservación se lleva a cabo una serie de distintos procesos fermentativos, como la fermentación acética, donde en las células vegetales se desarrollan ciertas bacterias coliformes que producen ácido acético a partir del ácido láctico y cuya actividad requiere una temperatura de 18 a 25 ° C.

Las fermentaciones secundarias son procesos bacterianos indeseables y que es preciso minimizar. La más peligrosa es la fermentación butírica, producida por bacterias que se desarrollan entre 20-40 °C. El incremento de amoniaco generado por esas bacterias tiende a favorecer la proliferación de especies del género Bacillus, que generan aún más amoníaco, y algunos microorganismos nocivos que pudren el alimento almacenado (Valencia *et al.*, 2011).

## 3.6.1 Factores que afectan el proceso y calidad de ensilaje

La eficiencia de la fermentación de un ensilado hace referencia a dos conceptos importantes: a) fermentación de azucares para producir ácido láctico que previene el desarrollo de *Clostridium*; b) reducción del pH en los tres primeros días para detener la proteólisis (Chilson *et al.* 2016). El ácido láctico es producido por fermentación disminuyendo el pH a porcentajes suficiente para inhibir el crecimiento de microorganismos que promueven la putrefacción; de lo contrario, estos microorganismos rompen el ácido láctico y los aminoácidos a acido butírico, amoníaco, aminas y otros productos de degradación (Conde, 2009).

## 3.7 Análisis de fibra por el método de Van Soest

El sistema para el análisis de las fracciones de la pared celular y fibra de los alimentos fue desarrollado por Van Soest *et al.*, en los años 60 del siglo pasado (Cozzolino *et al.*, 2006). Este permite determinar más específicamente la fracción de fibra cruda de los alimentos proporcionados a los animales, en el que la cantidad y calidad nutrimental de la fibra es significativa.

Este método fracciona los carbohidratos (Casallas, 2014). La fibra es la estructura química que le da rigidez a las plantas (Santini, 2014). La fibra verdadera está íntimamente ligada con los componentes que forman la estructura de la planta, la cual consiste de hemicelulosa, celulosa y lignina, estos son parte de la Fibra Detergente Neutra (FDN). La otra fracción es la Fibra Detergente Ácida (FDA), está constituida de celulosa y lignina (Aguilar, 2015).

#### 3.7.1 Fibra Detergente Neutra (FDN)

El conocimiento de la digestibilidad de los alimentos es básico para establecer su valor nutritivo y, por tanto, para la formulación de raciones para animales. En la búsqueda de una mejor caracterización química de los forrajes, se consideró más conveniente, dividir la materia seca en: contenidos celular y pared celular. La FDN es el material insoluble en una solución detergente neutra (método de los detergentes de Van Soest) y se compone de celulosa, hemicelulosa, lignina y sílice, y se le denomina pared celular. La misma se correlaciona inversamente con el consumo voluntaria de materia seca. Ocupan espacio en el rumen, se digieren lentamente y en diferente porcentaje, la parte o diferencia que es soluble en detergente neutro se

considera como contenido celular y es totalmente digerible (Lopez, 2014). Existen otros componentes minoritarios como residuos de algodón cenizas y nitrógeno. Para la determinación de fibra detergente neutra sugieren la utilización de amilasas termoestables especificas (libres de actividad hemicelulosa, proteasa o glúcanasa), especialmente en concentrados o ensilados de maíz, y la corrección por el contenido en cenizas, la proteasas una enzima que cataliza la digestión de otras proteínas (Van Soest *et al.*, 1991).

# 3.7.2 Fibra Detergente Ácida (FDA)

Es la proporción de la muestra de alimento que es insoluble en un detergente acido (método de los detergentes de Van Soest). Esta básicamente compuesta por celulosa, lignina y sílice. La importancia de la misma es que esta inversa correlacionada con la digestibilidad del forraje (López, 2014). A medida que la FDA aumenta, se reduce la capacidad de digerir o la digestibilidad del forraje y la energía que contendrá (Fernández, 2017).

Este procedimiento permite determinar la lignocelulosa en los alimentos. Además también contiene sílice. El método de fibra detergente ácido (FDA) es el paso previo para la determinación de lignina (López, 2014).

#### 3.8 Ácidos Fenólicos

Los fenoles son compuestos químicos localizados en frutas y vegetales, lo cual origina una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en plantas, en su mayoría derivados de la fenilamina y en menor cantidad de la tirosina (Porras-

Loaiza y López-Malo, 2009; López et al. 2015). La estructura guímica de los fenólicos se basa en el fenol, que es la molécula básica. El fenol se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH) (Peñarrieta et al., 2014). Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Es importante recalcar que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos. Por ejemplo, los ácidos hidroxicinámicos son más efectivos en términos de la actividad antioxidante que los ácidos hidroxibenzoicos (Peñarrieta et al., 2014). Su capacidad antioxidante va a depender del compuesto al que esté conjugado, que pueden ser azúcares como la galactosa, glucosa arabinosa. La principal fuente de compuestos fenólicos en la dieta son los alimentos de origen vegetal por ejemplo: frutas, verduras, semillas, flores, etc. (Navarro et al., 2017). Los ácidos fenólicos como el gálico, vianillinico, phidroxibenzoico, y los aldehídos como la vianillina, son abundantes en plantas superiores y helechos. La función antioxidante de los polifenoles radica en la amplia gama de actividades biológicas como eliminación de radicales libres, quelación metálica y su capacidad para la modulación de enzimas, así como sus efectos sobre las vías de señalización celular y en la expresión de genes (Rodrigo et al., 2011). La hesperidina y neohesperidina se han reportado en las naranjas dulces (Merken y Beecher, 2000).

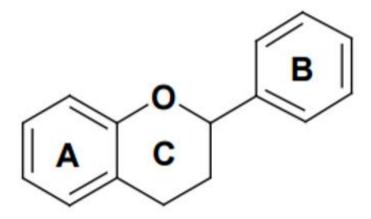
#### 3.9 Flavonoides

Los flavonoides se refieren a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo, violeta y azul de las flores y los frutos, atraen a animales polinizadores y participan en el crecimiento y desarrollo de la planta (lelpo et al., 2000).

Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Andersen y Markham, 2006).

Son un tipo particular de los polifenoles presentes en plantas, y son los compuestos responsables del color de las flores y frutas. El término flavonoide viene del latín "flavus", que significa amarillo, ya que muchos flavonoides purificados son de color amarillo. La estructura química típica de flavonoides consta de tres anillos: benzopirano 2-fenil, un anillo dihidroxilados fenólicos en las posiciones 5 y 7, (denotado A), un segundo anillo fenólico generalmente mono-hidroxilado, orto-dihidroxilados o vic- trihidroxilados (que se denota B), que también pueden contener grupos metoxi (O-CH3) como sustituyentes y el anillo C, que puede ser un anillo heterocíclico con oxígeno pirano, pirylium o de forma pirona (Peñarrieta et al., 2014). Las flavanonas como hesperitina y naringenina y sus respectivos glicósidos (la hesperidina y la naringenina), son los compuestos más abundantes, aunque también se han reportado bajas concentraciones de flavonoles como la quercetina y las flavonas polimetoxiladas como la nobitelina y la sinensetina (Ramful et al., 2010; Goulas y Manganaris, 2012).

Estos compuestos presentan en su estructura un número variable de grupos hidroxilo, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante y excelentes propiedades de quelación de metales (Kumar *et al.*, 2012; Thilakarathna y Rupasinghe, 2013).



**Figura 2**. Estructura básica de los flavonoides. Anillos aromáticos (A y B), heterociclo oxigenado (C) (Ochoa y Ayala, 2004)

Se han identificado más de 5,000 flavonoides, entre los que se pueden destacar:

- 1) Ácido elágico: se encuentra en frutas como la uva y las verduras.
- 2) Antocianidinas: pigmentos responsables de los colores rojo-azulado y rojo de las cerezas.
- 3) Catequina: se encuentra en el té negro y verde.
- 4) Citroflavonoides: como la quercetina, limoneno, hesperidina, rutina y narangenina. El sabor amargo de la naranja, del limón y el de la toronja lo otorga la narangenina.
- 5) Isoflavonoides: tales como la genisteína y la daidzeína, presentes en los alimentos de soya como tofu, leche, porotos, proteína vegetal, tempeh, miso y harina.

- 6) Kaemferol: encontrándose en brócolis, remolacha roja y rábanos.
- 7) Proantocianidinas: que aparecen en las semillas de las uvas, en el extracto de corteza de pino marino y en el vino tinto (Ross y Kasum, 2002).

La función antioxidante de los flavonoides depende de las combinaciones de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos, también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A<sub>2</sub>; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa (Escamilla *et al.*, 2009).

#### 3.10 Inclusión de la naranja en alimentación animal

Agregar subproductos de naranja en dietas para rumiantes representa una alternativa ante el alto costo y disponibilidad de los granos. Torres (2017), realizó una investigación que tuvo como objetivo determinar los parámetros de fermentación *in vitro* con contenidos crecientes de pulpa de naranja deshidratada (PND) al (0, 5, 10, 15 y 20 %) en dietas para corderos, observó que la inclusión del 20% de PND propició mejora de fermentación ruminal *in vitro* asociándose a una degradación de MS.

Bermúdez-Loaiza et al. (2015), evaluaron la inclusión de ensilaje de frutos enteros de naranja en 26 hembras bovinas F1 (Cebú x Holstein) con promedio de 8 años de

edad, 508 kg de peso vivo, cinco partos y 184 días de lactancia, durante un período experimental de 28 días (7 de adaptación y 21 de muestreo), distribuidos en dos grupos de manera aleatoria: el grupo H0 control (n=13) sometido a la alimentación convencional de la granja y el grupo H1 (n=13) al cual se le remplazó el 30% del concentrado comercial por la misma cantidad en MS de ensilaje de naranja (35 kg). Se evaluaron cambios en producción, porcentaje de sólidos totales, proteína bruta, grasa total, pH, acidez de la leche y pH ruminal. Los resultados indican que el ensilaje de naranjas enteras es una alternativa viable para la alimentación de bovinos, sin ningún efecto negativo sobre el desempeño de los animales.

Un efecto semejante fue observado al alimentar bovinos (cruza Cebú) con cítricos como suplemento energético (Coppo *et al.*, 2006).

López (2007) elaboró y validó dietas balanceadas para la engorda de ganado ovino, sustituyendo diferentes porcentajes (0, 15 y 30%) de una dieta tradicional, con harina de bagazo de naranja, dándole un uso alternativo a este subproducto. Se elaboraron las dietas con una sustitución de 0, 15 y 30% de harina de naranja y se balancearon conforme a los nutrientes presentes en cada uno de los ingredientes, encontrándose que es posible su aporte en la dieta sin que se afecte los parámetros productivos.

#### 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los sistemas de producción, el elevado costo de los insumos para la alimentación provoca que se disminuya la producción. En la industria de la juguería, la gran cantidad de desechos en el procesado de jugo de naranja y desperdicios de cosecha provocan un problema ambiental a nivel de plantas industriales y juguería; ya que son arrojados al medio ambiente, no obstante, ofrece al mismo tiempo una oportunidad de alimentación suplementaria para rumiantes (Fernández, 2015). Pero la fácil descomposición de los desechos de naranja hace necesaria la búsqueda de mejores métodos para la conservación (López, 2007).

La producción de naranja es estacional y, por lo tanto, la obtención de desecho de naranja, lo que hace necesaria la conservación de los desechos de naranja, sin embargo se desconoce el mejor método de conservación y los cambios en sus propiedades nutrimentales y antioxidantes durante el proceso (Gómez y Schwentesis, 1997).

# **5.- HIPÓTESIS**

• El estado oxidativo y valor nutrimental de desechos de naranja proveniente de juguerías varía con los diferentes métodos de conservación.

#### 6.- OBJETIVO

# 6.1 Objetivo General

 Determinar la capacidad antioxidante y composición química de desechos de naranja con diferente método de conservación a diferente tiempo.

# 6.2.- Objetivos Específicos

- Comparar la concentración de ácido láctico y pH de los desechos de naranja fresca y ensilados a diferente tiempo.
- Comparar la composición nutrimental de los desechos de naranja fresca, ensilados a diferente tiempo y deshidratado al sol.
- Comparar la concentración de vitamina C presente en los desechos de naranja fresca, ensilada a diferente tiempo y deshidratada al sol.
- Comparar la capacidad antioxidante en los desechos de naranja fresca, ensilada a diferente tiempo y deshidratada al sol.
- Comparar los ácidos fenólicos y flavonoides de los desechos de naranja.
- Determinar el tiempo óptimo de ensilaje en desechos de naranja

# 7.- JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, se ha buscado utilizar subproductos agroindustriales en la alimentación animal para reciclar materiales que podrían causar contaminación ambiental y disminuir el costo de producción del ganado, que se ha incrementado últimamente, principalmente debido a los precios de los cereales. Una alternativa de bajo costo y fácil disponibilidad son los residuos de naranja (Mayer, 2015).

La finalidad del presente trabajo es aportar información que enriquezca el conocimiento actual sobre el uso de desechos de naranja los cuales pueden ser usados para la alimentación de animales, y a su vez proporcionar fuentes de antioxidantes naturales de fácil acceso. Aunado a eso el desconocimiento del mejor método de conservación y la escasa información sobre el estado oxidativo y valor nutricional de los desechos de naranja se realiza el siguiente trabajo de investigación bajo tres métodos de conservación, y así poder determinar cuál es la mejor opción que proporcione los más altos niveles de antioxidantes y valores nutricionales; para ofrecer a los animales en la época de escasez de insumos y forrajes.

# 8.- MATERIAL Y MÉTODOS

## 8.1 Descripción del área donde se realizó el estudio

El estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca; localizada entre las coordenadas 17°04' de latitud norte y 96°43' de longitud oeste a una altura de 1,550 msnm en la parte central del estado perteneciente a la región de Valles Centrales como se muestra en la figura 3 (INAFED, 2017).

En el laboratorio de nutrición animal de la FMVZ se realizaron los análisis de medición de pH, proteína cruda, fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN).

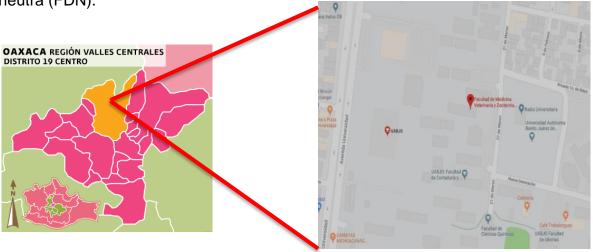


Figura 3. Macro localización de la FMVZ – UABJO (INAFED, 2017)

En laboratorios del departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México se realizaron los análisis de capacidad antioxidante y vitamina C; localizada entre las coordenadas 19° 20' latitud Norte y 99° 11' longitud Oeste, una altitud de 2268 msnm, al Sur de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (UNAM, 2020)

En laboratorios del Colpos Montecillo se realizaron los análisis de los ácidos fenólicos y flavonoides.

En laboratorios de nutrición animal de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Cuajinicuilapan de Guerrero se realizó el análisis de ácido láctico.

#### 8.2 Periodo de Estudio

El estudio se realizó en etapas. La primera comprendió del 29 de agosto al 8 diciembre del año 2017; la segunda se realizó del 18 de diciembre del año 2017 al 20 de noviembre del 2018.

#### 8.3 Tratamientos

Se usaron desechos de naranjas variedad valencia tardía provenientes del estado de Veracruz (Gómez y Schwentesis, 1997), que fueron recolectados en dos juguerías de la ciudad de Oaxaca. En el cual se realizaron tres tratamientos que consistieron:

- > T1: desecho de naranja en fresco
- > T2: desecho de naranja deshidratado al sol
- ➤ T3: ensilado de desecho de naranja a diferente tiempo (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días).

La recolección del desecho de naranja se realizó por 7 días, los últimos días de agosto y primeros días de septiembre de 2017, inmediatamente se trituraron utilizando una criba de 18 mm de diámetro y una vez homogenizados se tomaron 3 muestras. La primera muestra se conservó en fresco, la segunda deshidratada al sol y la tercera fue ensilada. El procedimiento se describe a continuación.

## 8.3.1 Fresco

Se tomaron tres muestras, una de 100 g de desecho de naranja el cual fue guardado a –80 °C en un ultracongelador Thermo Scientific MR modelo 8600 Series, para posteriormente realizarle análisis de vitamina C, capacidad antioxidante y cromatografía (Figura 4); la segunda muestra de 500 g la cual se colocó en una charola para posteriormente deshidratarlas en la estufa a una temperatura constante de 40 °C por 48 h, una vez transcurrido el tiempo se guardó la muestra en bolsas de papel para análisis bromatológico y la tercera muestra de 50 g sé licuo para medición del pH.



**Figura 4.** Pesaje de muestra fresca de desecho de naranja previo al tratamiento de congelación.

## 8.3.2 Ensilado de desecho de naranja

El desecho de naranja triturado se introdujo en 7 botes de plástico (microsilos) con capacidad de 4 litros cada uno, comprimiéndolos para extraerles el oxígeno que

pudiera quedar dentro del bote (Figura 5). Una vez lleno se cerraron herméticamente y se colocaron en un lugar seco y fresco. El procedimiento se repitió durante 7 días (Figura 7), en total se trabajó con 49 microsilos.

Los microsilos se abrieron en las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 después del llenado, de tal manera que existieron microsilos destapados en las diferentes semanas de 7 diferentes días de recolección de desechos de juguería.

Cuando se abrieron los microsilos se tomaron tres muestras, la primera muestra de 50 g sé licuó para medición del pH; la segunda muestra de 100 g fue guardada en bolsa de plástico previamente identificada y depositada en el ultracongelador a -80 °C para su posterior análisis de capacidad antioxidante, tipos de antioxidantes y vitamina C, y la tercera muestra de 500 g se colocó en una charola para deshidratarla en la estufa a una temperatura constante de 40 °C por 48 h, una vez transcurrido el tiempo se guardó la muestra en bolsas de papel para posteriormente realizar su análisis bromatológico (Figura 6).



**Figura 5.** Llenado y compactación de microsilos de desecho de naranja.



**Figura. 6.** Toma de muestra del microsilo de desecho de naranja.



Figura 7. Almacenaje de los microsilos de desecho de naranja.

# 8.3.3 Deshidratado de desecho de naranja

La tercera muestra fue deshidratada, el procedimiento consistió en tomar la misma cantidad que se utilizó para el llenado de un bote de 4 litros. El secado se realizó en un desecador artesanal a temperatura promedio de 45 °C por cuatro días (Figura 8), diariamente se movió la muestra para que tuviera una mejor deshidratación. Una vez deshidratado se guardó en bolsas de papel.



Figura 8. Desecho de naranja en deshidratador solar.

## 8.4 Medición de pH

La medición de pH se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UABJO. Para lo cual se ocupó el siguiente equipo, material y reactivo:

- Materiales y equipo:
- Guantes
- Licuadora (Oster)
- Agua destilada
- Probeta
- Vaso de precipitados
- Papel filtro
- ♣ Potenciómetro (Thermo Scientific, modelo Orion 3 Star)

Para la medición de pH en la naranja fresca y ensilada se pesaron 50 g de muestra (Figura 9) los cuales se depositaron en un vaso de licuadora, se agregó 100 ml de agua destilada, fue licuado durante 5 minutos y posteriormente se filtró (Figura 10) para obtener el extracto el cual fue depositado en un vaso de precipitado y se tomó la lectura de pH con un potenciómetro (Thermo Scientific, modelo Orion 3 Star) (Figura 11).



**Figura 9.** Pesaje de muestra de desecho de naranja para medir el pH.



**Figura 10.** Filtrado de muestra de desecho de naranja licuada.



**Figura 11.** Lectura de pH del extracto de desecho de naranja.

## 8.5 Extracción de ácido láctico

La medición del ácido láctico por la técnica de Kinberley y Taylor (1996) se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Guerrero ubicada en Cuajinicuilapan.

- Reactivos:
- Ácido metafosfórico (Meyer®)
- Agua destilada
- Ácido sulfúrico (Baker, 97.3%)
- ♣ CuSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O (Merk; 4 %)
- Phidroxidifenil (Aldrich; 1,5 %)
- Material:
- Gasas
- Tubos de ensaye (Kimax®; 18 x 150 mm)
- Equipo:
- ♣ Estufa (RIOSSA® HCF-41, México)
- ♣ Vortex (Genie 2, Daigger, USA)
- Espectrofotómetro UV-Vis (JENWAY® 6850 UV, UK)

Del extracto que se hizo para medir pH se tomaron 4 ml y se le agregó 1 ml de ácido metafosfórico al 25 % (Meyer®) (Figura 12), después se vacío en tubo de plástico con capacidad de 12 ml (Figura 13), los cuales se guardaron en refrigeración a una temperatura de 6 °C para su posterior análisis. El envío se realizó en una hielera de

unicel con refrigerantes para conservar la temperatura durante el traslado para su análisis.

La muestra se diluyó (1:50) con agua destilada, se tomó 0.5 ml de la muestra diluida y se mezcló con 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Baker, 97.3%) en un tubo de ensaye (Kimax®; 18 x 150 mm) y se incubó 100 °C por 10 min en una estufa (RIOSSA® HCF-41, México). Cuando la temperatura se redujo a 25 °C, se adicionaron 50 μl de CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O (Merk; 4 %) y 100 μl de phidroxidifenil (Aldrich; 1.5 %) e inmediatamente se mezclaron en un vortex (Genie 2, Daigger, USA). Las muestras reposaron 30 min y se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (JENWAY® 6850 UV, UK) calibrado con una curva patrón usando ácido láctico a diferentes concentraciones (r2=0.9994) de ácido láctico.



**Figura 12.** Medición de extracto de ensilado de naranja para análisis de ácido láctico.



**Figura 13.** Rotulación de tubo para guardar el extracto de ensilado de naranja.

## 8.6 Proteína cruda

La proteína cruda se determinó bajo el método de Kjendhal (AOAC, 2017). Para lo cual se ocupó el siguiente equipo, material y reactivo:

## Reactivos:

- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de sodio en lentejas (Meyer)
- Tabletas Kjeltec
- ♣ Verde de bromocresol
- ♣ Rojo de metilo
- Ácido bórico (Meyer)
- ♣ Alcohol etílico al 96%

## Material:

- Bureta graduada
- ♣ Tubos de digestión (Foss)
- Matraz volumétrico de 2000 ml
- Matraz volumétrico de 50 ml
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Pipeta
- Frascos color ámbar de 50 ml.
- Bandeja de plástico

## Equipo:

♣ Equipo Foss Kjeltec<sup>TM</sup> 8200

# Balanza analítica digital de 300 g (Velab, modelo VE-303)

Se pesó 1 g de muestra (Figura 14), luego se colocó en los tubos de digestión FOSS previamente identificados, posteriormente le fue agregado dos tabletas Kjeltec y 12 ml de ácido sulfúrico concentrado; se colocaron los tubos en el digestor por el lapso de una hora (Figura 15). Para la destilación se preparó una solución de hidróxido de sodio al 40 %. lo cual para su preparación se ocupó una bandeja con agua y hielos en la cual se colocó un vaso de precipitado de 1 litro, se le agregó 500 ml de agua destilada y 400 g de hidróxido de sodio, se dejó enfriar y aforó a un litro; de igual manera se prepararon los indicadores Foss en un matraz volumétrico de 50 ml, se pesó 0.05 g de verde de bromocresol y se agregó 50 ml de alcohol etílico al 96 %, se agitó, aforó y vació en un frasco ámbar rotulado, en otro matraz se repitió el procedimiento para el rojo de metilo. Para la solución receptora Foss la preparación fue en un matraz volumétrico de 2000 ml en el cual se colocó 80 g de ácido bórico, 600 ml de agua destilada caliente, se mezcló hasta disolver el ácido, le fue agregado 20 ml de indicador verde de bromocresol y 14 ml de indicador rojo de metilo, después fue aforado, a esta solución se le realizó una prueba de color, agregando 100 ml de agua destilada en un matraz y agregando 24 ml de solución receptora, al obtener un color morado es indicativo que la solución si es correcta y fue vaciado en un recipiente previamente identificado para posteriormente poner los tubos a destilar cada uno (Figura 16), del cual el destilado fue puesto en un matraz. El último paso fue la titulación donde en una bureta se colocó 25 ml de ácido sulfúrico al 0.1 N, y por goteo se vertió en el matraz hasta que se igualó el color con el de la prueba (Figura 17); para calcular el porcentaje de nitrógeno se realizó por la formula siguiente: mililitros gastados de ácido sulfúrico al 0.1 N, por la normalidad del ácido sulfúrico, por la constante de 1.4 entre el peso de la muestra; y para calcular el porcentaje de PC se multiplicó el porcentaje de nitrógeno obtenido por 6.25 que es un factor de conversión AOAC (2017).



**Figura 14.** Pesaje de la muestra de desecho de naranja para análisis de proteína cruda.



**Figura 16.** Destilación de la muestra digerida con hidróxido de sodio (NaOH).



**Figura 15**. Muestra de desecho de naranja en el digestor del equipo FOSS.



**Figura 17.** Titulación de la muestra con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

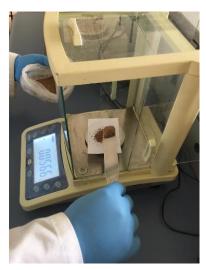
## 8.7 Determinación de fibra detergente ácida

La FDA se determinó bajo el método de Van Soest (1994). Para lo cual se ocupó el siguiente equipo, material y reactivos.

- Reactivos:
- ♣ Decahidronaftaleno (Decalin) (Sigma)
- Acetona
- Agua destilada
- Ácido sulfúrico
- Cetriltrimetril Aminiobromuro CTAB (Meyer)
- Material:
- ♣ Papel filtro libre de cenizas número 1 (Whatman)
- Pizeta
- Equipo:
- ♣ Balanza analítica (Velab, modelo VE-303)
- ♣ Digestor de fibra (Tecnilab modelo FC-6U)
- Estufa (Riossa, modelo E-71).
- Bomba de agua semisumergible (GB, modelo LP9W)
- ♣ Bomba de vacío (Siemens, modelo 1RF425A-2YC34).
- Cristalería:
- Vasos de Berzelios
- Matraz Kitasato

- Embudo Büchner
- Pipeta de 10 ml
- Desecador
- Matraz volumétrico de 2000 ml

Para iniciar el análisis se preparó la solución ácida con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1N, en un matraz volumétrico de 2000 ml se agregó 500 ml de agua destilada y 53.4 ml de ácido sulfúrico para después enrazarlo con aqua destilada. Posteriormente se preparó la solución ácida detergente pesando 40 g de Cetiltrimetril Amoniobromuro (CTAB), el cual se agregó al matraz volumétrico y se le añadió la solución ácida y se agitó para disolver el CTAB. El siguiente paso fue pesar la muestra de 1 a 2 g la cual se depositó en un vaso de Berzelios, el cual se rotuló con el número de muestra (Figura 18), se le agregó 100 ml de la solución detergente ácida y 2 ml de Decalin, se colocaron en el digestor de fibra para dejarlo refluir por 60 minutos (Figura 19). Una vez que paso el tiempo de reflujo se armó la bomba de vacío con el matraz kitasato y el embudo de büchner, y se colocó el papel filtro (Whatman libre de cenizas número 1) que fue tarado (12 horas) en el desecador, se dejó enfriar por 20 minutos y se pesó. Se filtró la muestra a vacío en papel filtro, se lavó el residuo 2 o 3 veces con agua caliente y acetona (Figura 20). Ya que se enjuagó la muestra se dejó el papel con el residuo en la estufa durante 12 horas a 100 ° C. Se extrajeron de la estufa y se colocaron en un desecador por 20 minutos para dejarlos enfriar y poderlos pesar (Figura 21). Una vez obtenidos los datos se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de fibra detergente



**Figura 18.** Pesaje de la muestra para análisis de fibra detergente ácida.



**Figura 19**. Reflujo de la muestra en el digestor de fibra.



**Figura 20**. Filtrado y enjuague de la muestra con agua destilada y acetona.



**Figura 21**. Pesaje final de muestra en el papel Wathman.

# 8.8 Determinación de fibra detergente neutra

La FDN se determinó bajo el método de Van Soest (1994). Para lo cual se ocupó el siguiente equipo, material y reactivos.

- Reactivos:
- Sulfito de Sodio Anhidro (J. T. Baker)
- Borato de Sodio, 10-Hidrato, Cristal (J. T. Baker).
- Lauril Sulfato de Sodio (Meyer)
- ♣ Fosfato de Sodio Di básico (Meyer)
- Decahidronaftaleno (Decalin) (Sigma)
- ♣ E.D.T.A Sal Di sódica (Meyer)
- Acetona
- Agua destilada
- Material:
- ♣ Papel filtro libre de cenizas número 1 (Whatman)
- Pizeta
- Equipo:
- Balanza analítica (Velab, modelo VE-303)
- ♣ Digestor de fibra (Tecnilab modelo FC-6U)
- ♣ Estufa (Riossa, modelo E-71).
- ♣ Bomba de agua semisumergible (GB, modelo LP9W)
- ♣ Bomba de vacío (Siemens, modelo 1RF425A-2YC34).
- Cristalería:

Vasos de Berzelios sin pico capacidad de 600 ml

Matraz Kitasato

Embudo Büchner

Pipeta de 10 ml

Desecador

Matraz volumétrico de 2000 ml

Para iniciar el análisis se pesó 1 g de muestra y 0.5 g de Sulfito de sodio anhidro los cuales se depositaron en un vaso Berzelius sin pico, después se le agregaron 100 ml de solución neutra detergente y 2 ml de Decahidronaftaleno (Decalin) (Figura 22), para después colocar el vaso de Berzelius con la muestra y reactivos en el digestor de fibra. Se dejó reflujar la muestra durante 60 minutos (Figura 23). Una vez que se cumplió el tiempo se apagó el digestor. Se instaló la bomba de vacío con el Kitasato y el embudo Büchner, al cual se le colocó papel filtro libre de ceniza previamente tarado y pesado. Se filtró la muestra a vacío en papel filtro, se lavó el residuo 2 o 3 veces con agua caliente y acetona (Figura 24). Ya que se enjuagó la muestra se dejó el papel con el residuo en la estufa durante 12 horas a 100 ° C. Se extrajeron de la estufa y se colocaron en un desecador por 20 minutos para dejarlos enfriar y poderlos pesar (Figura 25). Una vez obtenidos los datos se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de fibra detergente neutra:

% FDN = (<u>Peso papel estufa – Peso papel</u>) X 100 Peso Muestra



**Figura 22.** Añadiendo la solución neutra a la muestra de desecho de naranja.



**Figura 23.** Reflujo de la muestra de desecho de naranja en el digestor.



**Figura 24.** Filtrado y lavado de la muestra con agua destilada y acetona.



Figura 25. Pesaje final de la muestra con papel Wathman.

# 8.9 Determinación de Flavonoides y Fenólicos

El estudio se realizó en laboratorios del Área de Fitoquímica del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillos.

Para lo cual se ocupó el siguiente equipo, material y reactivo.

#### Reactivo:

- Etanol
- Ácido trifluoracético
- Acetonitrilo
- Agua bidestilada

## Material:

- ♣ Balanza analítica (Velab)
- Cápsula de porcelana

## Equipo

- Baño María con agitador
- Centrífuga (Thermo)
- Liofilizador
- Cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1100
- Columna Hypersil ODS 5μm de diámetro de partícula, 125 x 4.0 mm d. i. marca
   Agilent Technologies
- ♣ Columna: Nucleosil 100 A 125 x 4.0 mm d. i., 5 μm marca Macherey-Nagel

Se utilizaron 0.150 g de las muestras del T1 y las muestras de ensilado que fueron quardadas en el ultracongelador; las cuales fueron liofilizadas, una vez que se deshidrataron se molieron en una cápsula de porcelana, se utilizó una balanza analítica para pesar 0.150 g de cada muestra (Figura 26) y fueron depositadas en tubos añadiéndole 3 ml de etanol al 80%, los cuales se colocaron en baño maría con agitador con dos periodos de 5 minutos y un periodo de reposo; seguidos de una centrifugación por 5 minutos a 3000 rpm, después con una pipeta se tomó un ml del extracto y se colocaron en viales previamente identificados para posteriormente colocarlos en el cromatógrafo. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1100, equipado con un inyector automático modelo 1200 y un detector de arreglo de diodos (Figura. 27). La columna fue una Zorbax SB-C8, 4.6 x 75 mm, la fase móvil fue: A: agua con 0.1% de ácido trifluoracético y B: acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoracético. El análisis fue por gradiente T (0.10 min) 85 A %, 15% B; T (20 min) 65% A, 35% B y T 25 min) 65% A, 35% B. La velocidad de flujo fue de 1.0 ml/min<sup>-1</sup> a una temperatura de 30 °C y el detector se ajustó a 254 nm.

Para obtener la curva de calibración de los flavonoides se utilizaron de referencia 8 estándares como rutina, floridzina, miricetina, quercetina, naringenina, floretina, apigenina, galanginina; también se usó una columna Hypersil ODS 5 μm de diámetro de partícula, 125 x 4.0 mm marca Agilent Technologies. Por ácidos fenólicos, una columna: Nucleosil 100 A 125x 4.0 mm d. i. 5 μm, marca Macherey-Nagel con un gradiente de H<sub>2</sub>O a pH 2.5 con TFA (ácido trifluoroacético) y (B) ACN (acetonitrilo); para ácidos fenólicos se incluyen los siguientes: flujo, 1 ml/min; temperatura 30 °C; volumen de inyección variable; y tiempo de análisis 25 min. Los estándares utilizados

fueron 10: Protocatecuico, hesperidina, galico, galo, clorogénico, p-camurico, cafeico, vainillico, pag-hidroxibenzoico y siringico de la marca Sigma-Aldrich, USA.



**Figura 26.** Pesaje de la muestra para obtener el extracto de desecho de naranja pasa su posterior análisis cromatográfico.



**Figura 27**. Equipo cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1100 analizando la muestra de desecho de naranja.

# 8.10 Extracción de antioxidantes para determinación de la capacidad antioxidante

Se ocupó el siguiente equipo, material y reactivos.

## ♣ Reactivos:

- Agua destilada
- Metanol RA
- Acetona RA
- ♣ HCI 2N
- ♣ Acetato de sodio (3H<sub>2</sub>0)
- Ácido acético glacial
- Agua desionizada
- ♣ TPTZ (2,4,5-tripridyl-s-triazine)
- Material
- ♣ Vasos de precipitados
- Potenciómetro
- Tubos de 50 ml
- Celdas desechables para espectrofotometría
- Equipo:
- Centrífuga
- Agitador orbital
- Agitador magnético
- Baño con agitador

- Espectrofotómetro (Thermo Scientific)
- Molino eléctrico
- Balanza Analítica
- Pipeta

Antes de determinar la capacidad antioxidante total, se obtuvo un extracto de cada muestra de acuerdo con el método reportado por Rojas-Barquera y Narváez-Cuenca (2009). Para ello, se colocaron 0.5 g de muestra seca molida o 2 g de muestra húmeda molida (fresca o ensilada) (Figura 28) en tubos de 50 ml con 10 ml de una mezcla de metanol y agua (50/50, v/v) acidificada a pH 2 con HCl 2N, y se pusieron en agitación por 1 hora usando un agitador orbital, luego se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, cada sobrenadante se recuperó y reservó, cada precipitado se transfirió a tubos de 50 ml y se le agregó 10 ml de una mezcla de acetona y agua (30/70, v/v), se puso en agitación por 1 hora (Figura 29); y luego se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. El segundo sobrenadante se mezcló con el primero según correspondió a cada muestra, se identificó como extracto MA y se guardaron en un congelador a -40 °C, hasta su análisis La determinación de capacidad antioxidante se realizó mediante el método de poder antioxidante por reducción férrica (FRAP) de Benzie y Strain (1999), con modificaciones.

Alícuotas de 100 µl del extracto de cada muestra se agregaron a 1.5 ml de una mezcla de reacción formada por disolución amortiguadora de acetato 300 mM a pH de 3.6 (3.1 g de acetato de sodio más 16 ml de ácido acético glacial aforados a 1 litro), disolución acuosa de cloruro férrico hexahidratado 20 mM y disolución de

disolución de TPTZ 10 mM (disuelto en HCl 40 mM), en una relación 10:1:1 respectivamente. Los extractos más la mezcla de reacción se incubó en agitación a 37 °C por 20 minutos, con base en el trabajo de Perez-Jimenez y Saura-Calixto (2007), y se obtuvieron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-VIS a 593 nm. Las muestras se analizaron por duplicado. Los resultados se calcularon usando curvas patrón de trolox disuelto en etanol a diferentes concentraciones (0.2-1.6 nM). Los resultados se reportaron como nmol de trolox por g de muestra (materia seca).





**Figura 28**. Pesaje de la muestra para extracción de antioxidantes para determinación de la capacidad antioxidante

**Figura 29**. Muestras en agitador orbital a temperatura ambiente para obtener el sobrenadante de desecho de naranja.



**Figura 30.** Preparación de la muestra reacción (MR).



**Figura 31.** Adición de MR y muestra en viales para incubar.



**Figura 32.** Colocación de celdas en espectrofotómetro y lectura de las muestras.



**Figura 33.** Preparación del reactivo 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ).

## 8.11 Determinación de ácido ascórbico

Se ocupó el siguiente equipo, material y reactivo.

## Material

- ♣ Tubos de 2 ml
- Tubos de 15 ml
- Celdas desechables para espectrofotometría

#### Reactivos

- Agua destilada
- Reactivo de Folin-Ciocalteu fenol
- Ácido tricloroacético RA
- Ácido ascórbico RA

# Equipo

- Agitador
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific)
- Centrífuga
- Agitador Orbital

Antes de determinar la concentración de ácido ascórbico, se obtuvo un extracto de cada muestra de acuerdo con el método reportado por Rojas-Barquera y Narváez-Cuenca (2009). Para ello, se colocaron 0.5 g de muestra seca molida o 2 g de muestra húmeda molida (fresca o ensilada) en tubos de 50 ml con 10 ml de una mezcla de metanol y agua (50/50, v/v), acidificada a pH 2 con HCl 2N, y se pusieron

en agitación por 1 hora usando un agitador orbital (Figura 34). luego se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, cada sobrenadante (extracto) se recuperó, se identificó como extracto M y se guardó en un congelador a -40 °C, hasta su análisis. La determinación de ácido ascórbico se realizó de acuerdo con el método reportado por Rojas-Barquera y Narváez-Cuenca (2009). Se mezclaron 0.4 ml del extracto M de cada muestra con 1.6 ml de ácido tricloroacético al 10 % usando tubos de 2 ml (Figura 35). Los tubos se agitaron vigorosamente por 5 segundos en un vortex y se incubaron en agua con hielo por 5 minutos (Figura 36). A continuación, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos, de cada tubo se tomó 1 ml del sobrenadante y se mezcló con 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu fenol 10 % en tubos de 2 ml (Figura 37). Los tubos se agitaron por 5 segundos y luego se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Después, se obtuvieron las absorbancias de las muestras usado un espectrofotómetro UV-VIS a 760 nm (Figura 38). Las muestras se analizaron por duplicado. Los resultados se calcularon usando curvas patrón de ácido ascórbico a diferentes concentraciones (20-160 µg/ml). Los resultados se reportaron como µg de ácido ascórbico por gramo de materia seca.



**Figura 34.** Muestras de naranja en agitador orbital a temperatura ambiente.



**Figura 35**. Adición de ácido tricloroacético al extracto de las muestras de desecho de naranja



**Figura 36.** Incubación del extracto de las muestras en agua fría.



**Figura 37**. Adición del reactivo Folin a los sobrenadantes de las muestras de desecho de naranja.



**Figura 38**. Colocación y lectura de muestras en el espectrofotómetro.



**Figura 39.** Preparación de los tubos para estandarizar la curva.

# **8.12.- ANALISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos fueron capturados y ordenados en el programa Excel 2013 y posteriormente analizados en el programa SAS (2003). Se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett y de pruebas de normalidad con la prueba de Shapiro- Wilk. Cuando los datos no cumplieron con homogeneidad y normalidad de varianza se realizaron transformaciones como "Log" y "sqrt"; posteriormente se realizaron análisis de varianza utilizando como efecto fijo el tratamiento. La comparación de medias se realizó por la prueba de diferencia mínima significativa.

# 9.- RESULTADOS y DISCUSIÓN

## 9.1.- Materia Seca, FDA, FDN, y PC

En el cuadro 3 se muestran los porcentajes de materia seca, se puede observar que la cáscara de naranja deshidratada tiene un 88.87 % de MS dicho valor es mayor que el ensilado (P<0.05), donde se reportan promedios de 18.62 % (día 49) a 19.62 % (día 35). De igual manera se observa que en todos los días de ensilado existieron pérdidas de MS, al compararlas con el promedio de la muestra fresca.

Con respecto a fibra detergente ácida, de manera general, se observó que el ensilaje incrementó el porcentaje de FDA con respecto a la cáscara fresca (P<0.05), solo en el día 7 es similar (P>0.05) con respecto a la muestra fresca, posteriormente se incrementó hasta estabilizarse a partir del día 35 de ensilaje (P<0.05). El deshidratado no afectó esta variable (P>0.05). Los promedios de fibra detergente neutra son más estables solo se encontró que en el día 28 de ensilado, el porcentaje es mayor que en el deshidratado.

Se encontró que el deshidratado incrementó la proteína cruda (P<0.05) con respecto al fresco; de igual manera el ensilado lo incrementa no existiendo diferencia (P<0.05) entre los días de ensilaje, aunque se observa que a partir del día 35 existe una estabilización.

Volanis *et al.* (2004) mencionaron que el contenido de MS del ensilaje al inicio es de 25 % y al final de 21 %; al igual que en el presente estudio existió una pérdida de MS durante el ensilaje, estos autores lo atribuyen a la producción de gas, al respecto, Ashbell y Donahaye (1984) demostraron que la pérdida de materia seca de naranja

durante el ensilaje se debe a la filtración y la liberación de gas durante el período de fermentación. De la Rosa (2005) obtuvo de 18 a 20% de FDA, valores por debajo de los obtenidos y de 20 a 25% de FDN valores similares a los obtenidos en este trabajo; Piquer et al. (2009), encontraron 7.6% de proteína cruda en naranja fresca variedad Clementinas (*Citrus reticulate* × *Citrus auratium*) valores superiores al obtenido en el presente trabajo.

Piquer, (2006) menciona que las diferencias entre valores obtenidos de las diferentes variedades de naranja podrían atribuirse a la alta variabilidad de estos subproductos ya que su valor nutritivo está influenciado por factores que incluyen la fuente del fruto, la proporción de semillas y cáscaras y el tipo de procesamiento.

Mayer (2015), al ensilar la cáscara de naranja a 45 días reporta valores muy similares de MS, PC, FDA y FDN a los que se obtuvieron en el presente trabajo.

Cuadro 3.- Promedios de Materia Seca, FDA, FDN, y PC en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo

Tratamientos	% de MS	% de FDA	% de FDN	% de PC
Deshidratado	88.87 ±0.55 <sup>a</sup>	22.39 ± 1.27 <sup>d</sup>	24.33 ± 1.30 b	5.26 ± 0.17 b
Fresco	21.58 ±0.55 <sup>b</sup>	22.77 ± 1.27 <sup>cd</sup>	24.75 ± 1.53 ab	4.93 ± 0.16°
Ensilado				
7 días	18.65 ±0.55 <sup>c</sup>	26.88 ± 1.68 bc	24.82 ± 1.30 <sup>ab</sup>	$5.60 \pm 0.18$ ab
14 días	18.78 ±0.55 <sup>c</sup>	27.36 ± 1.27 <sup>b</sup>	25.85 ± 1.14 ab	$5.55 \pm 0.18$ ab
21dias	18.39 ±0.60°	30.33 ± 1.27 <sup>ab</sup>	25.58 ± 1.53 ab	5.74 ± 0.17 <sup>a</sup>
28 días	18.63 ±0.55 °	27.46 ± 1.27 <sup>b</sup>	28.06 ± 1.31 <sup>a</sup>	$5.56 \pm 0.18$ ab
35 días	19.62 ±0.55 °	$30.79 \pm 1.27$ ab	25.79 ± 1.14 ab	5.84 ± 0.17 <sup>a</sup>
42 días	19.03 ±0.55 <sup>c</sup>	31.41 ± 1.27 <sup>a</sup>	27.12 ± 1.14 ab	5.86 ± 0.17 <sup>a</sup>
49 días	18.62 ±0.55 °	31.02 ± 1.27 <sup>a</sup>	27.40 ± 1.31 ab	5.84 ± 0.17 <sup>a</sup>

**MS**: % de materia seca, **FDA**: % **de** fibra detergente ácida, **FDN**: % de fibra detergente neutra y **PC**: % **de** proteína cruda, <sup>a, b</sup> valores con distinta literal indican diferencia (P<0.05).

## 9.2.-Capacidad antioxidante y Vitamina C

Al comparar la capacidad antioxidante por efecto del deshidratado, se observa que este proceso incrementa la capacidad antioxidante, aunque estadísticamente no existió diferencia (-P≥0.05) con respecto a las muestras frescas. Durante el proceso de ensilaje se observa que la capacidad antioxidante se va incrementando (P< 0.05) con los días de ensilado, hasta alcanzar su valor máximo en el día 35.

Con respecto a vitamina C, el deshidratado de desecho de naranja presenta un valor alto (P< 0.05), respecto al desecho de naranja fresco. El ensilado de desecho de naranja a partir del día 7 no afectó la concentración de vitamina C (P>0.05).

La capacidad antioxidante de los extractos de frutos cítricos se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otro tipo de compuestos fenólicos (Bocco *et al.*, 1998; Kawaii *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2010)

Según Ferreira *et al.* (2018), la alta actividad antioxidante de los extractos de cáscara de cítricos puede explicarse por su composición fenólica, como hesperidina, naringina, rutina y ácidos cafeico y clorogénico.

Estos antioxidantes actúan para proteger contra la acumulación de especies reactivas de oxígeno, eliminándolos del sistema a través de la deshidrogenación irreversible. Por ejemplo, el ácido ascórbico reacciona directamente con O<sub>2</sub>-, HOO- y OH-, eliminando O<sub>2</sub> (ZOU, 2016). Barros *et al.* (2012) informaron que la pulpa de diferentes cítricos comerciales de Brasil contenía una mayor cantidad de ácido ascórbico en las cáscaras. La variación en las concentraciones reportadas por diferentes autores podría deberse a la variación en los cultivares, las etapas de

madurez y otros factores ambientales. Se ha encontrado que la vitamina C disminuye durante la gestación e inicio de lactancia (Salinas-Ríos *et al.*, 2017) Por lo que es interesante probar la suplementación cáscara de naranja durante estas etapas. Pliego (2018) reporta que la suplementación de vitamina C protegida con etilcelulosa durante esta etapa no afectó las variables reproductivas evaluadas y mejora la capacidad antioxidante en ovejas durante sincronización de estro e inicio de gestación.

Kwak (2018) comenta que la fermentación de granos de café verde durante 24 h fue efectiva para inducir un aumento significativo en la actividad antioxidante. En general, los antioxidantes previenen la autooxidación de los componentes de los alimentos y neutralizan la gran cantidad de radicales libres que se generan en el cuerpo humano (He *et al.*, 2012).

Sun (2014) propone que para aumentar la actividad antioxidante de los alimentos de origen vegetal mediante la fermentación es necesario considerar diversos factores como: las especies de microorganismos, el pH, la temperatura, el disolvente, el contenido de agua, el tiempo de fermentación, el tipo de alimento y las condiciones aeróbicas.

Lu (2019) reportó que en la germinación del frijol mungo (*vigna radiata*) con efecto de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con respecto al efecto de 0 horas luz, incremento la vitamina C, y explica que la producción de ROS aumenta cuando la planta se expone a la luz intensa, por lo tanto, aumenta la vitamina C para minimizar la producción de ROS. Por lo que esto podría explicar en parte la mayor concentración de vitamina C en el tratamiento deshidratado en el cual fue expuesto a

la luz la cáscara de naranja. Se sugiere que para poder corroborar el incremento de vitamina C, se debe medir la actividad de genes involucrados en la síntesis, el ácido deshidroascórbico y la actividad enzimática de la vitamina C. La estabilización de la actividad antioxidante en el ensilado del presente trabajo se dio a partir del día 21.

Cuadro 4.- Promedios de indicadores de Capacidad antioxidante y vitamina C en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo

Tratamientos	Micromoles de trolox (μg de trolox/ g de ms)	Vitamina C (µg de vitamina C/g de ms)	
Deshidratado	53.41951 ± 7137.46 bc	2013.53 ± 276.23 a	
Fresco	38.26580 ± 7146.72 <sup>c</sup>	1045.64 ± 273.48 <sup>b</sup>	
Ensilado			
7 días	54.95942 ± 7137.46 bc	1288.87 ± 273.48 <sup>b</sup>	
14 días	53.59797 ± 7137.46 bc	1112.38 ± 273.48 <sup>b</sup>	
21dias	65.02152 ± 7139.68 <sup>ab</sup>	1116.00 ± 273.48 <sup>b</sup>	
28 días	70.61054 ± 7139.68 ab	834.53 ± 273.48 <sup>b</sup>	
35 días	78.28820 ± 7139.68 <sup>a</sup>	950.43 ± 273.48 <sup>b</sup>	
42 días	65.14761 ± 7139.68 ab	1102.10 ± 273.48 <sup>b</sup>	
49 días	61.71932 ± 7139.68 <sup>ab</sup>	1142.60 ± 273.48 <sup>b</sup>	

Trolox: μg de trolox/ g de ms; Vitamina C: μg de vitamina C/g de ms;

<sup>&</sup>lt;sup>a, b</sup> valores con distinta literal en cada columna indican diferencia (P<0.05).

#### 9.3.- Indicadores de fermentación

El pH al momento de ensilar fue de 2.40, se incrementó (P<0.05) a 3.05 en los primeros 7 días de ensilado y llegó a 3.54 en el día 14. Del día 14 al 49, no existió diferencia (P>0.05), lo que podría indicar que existió una estabilización de la fase anaerobia de la fermentación a partir del día 14. Melo-Camacho et al. (2017) reportan un pH de 3.33 a 4.2 a los 21 días de ensilaje de naranja, valor muy similar al encontrado en el presente estudio. Wattiaux (2003) encontró que dicha estabilización se da a partir del día 21, esta fase es llamada semiesterilización de la masa de ensilaje, en el sentido que todo crecimiento bacteriano es paralizado, y eventualmente el crecimiento de la bacteria ácido láctica se inhibe a sí misma. El pH de ensilado de naranja se incrementa por la producción de algunas especies proteolíticas que degradan el nitrógeno protídico de la cáscara hasta ácido butírico y amoníaco, el amoníaco producido tiende a elevar el pH en el silo, caso contrario al ensilado de maíz que se disminuye durante el proceso (De la Rosa, 2005). La importancia del pH comprendido entre 3 y 4 en ensilaje es que las bacterias lácticas llevan a cabo una buena fermentación en condiciones de anaerobiosis, (Ruiz et al., 2006). Al comparar la concentración de ácido láctico, se observa que durante el ensilaje se incrementa este valor (P<0.05) respecto al desecho de naranja fresca, hasta establecerse en el día 28. Por lo que podríamos decir que a partir de este día existe una estabilización del ensilado de desecho de naranja ya que también se mantiene estable el pH, la capacidad antioxidante y los demás compuestos. A partir de la fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del

forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad ácido acético (Weinberg y Muck, 1996; Merry et al., 1997). Los azúcares, materia seca y composición de los azúcares, combinados con las propiedades del grupo BAC así como su tolerancia a condiciones ácidas o de presión osmótica, y el uso del substrato, influyen en forma decisiva sobre la capacidad de competencia de la flora BAC durante la fermentación del ensilaje (McDonald et al., 1991). Su acción es inhibida por escasez de azúcares solubles y acumulación de ácido láctico. Cuando esto ocurre, el bagazo o cáscara de naranja gueda estabilizado y se ha convertido en ensilado (De la Rosa, 2005). Las BAL epífiticas juegan un papel primordial en la fermentación del ensilaje; su concentración dentro del silo se convierte en un factor importante para la predicción de un buen proceso fermentativo (Lin et al., 1992). Las bacterias del ácido láctico se han empleado en los alimentos para producir péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y ácido c-aminobutírico, los cuales son útiles en la prevención y el tratamiento de la hipertensión (Kono y Himeno, 2000; Torino et al., 2013).

Cuadro 5.- Promedios de indicadores de fermentación en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo

Tratamientos	рН	Ácido láctico
Deshidratado	-	-
Fresco	$2.40 \pm 0.069$ b	1.10 ± 5.14 <sup>d</sup>
Ensilado		
7 días	$3.05 \pm 0.069^{b}$	13.33 ± 3.90 <sup>cd</sup>
14 días	$3.54 \pm 0.069^{a}$	$20.73 \pm 3.22$ bc
21dias	$3.73 \pm 0.069^{a}$	$26.32 \pm 3.51$ ab
28 días	$3.69 \pm 0.069$ <sup>a</sup>	$32.46 \pm 3.22^{a}$
35 días	$3.65 \pm 0.069$ <sup>a</sup>	$35.60 \pm 3.51^{a}$
42 días	$3.63 \pm 0.069^{a}$	$30.05 \pm 3.22^{a}$
49 días	$3.58 \pm 0.069^{a}$	$34.67 \pm 3.22^{a}$

**pH**: potencial de Hidrógeno, <sup>a, b</sup> valores con distinta literal en cada columna indican diferencia (P<0.05), - no se tomó muestra.

# 9.4.- Ácidos fenólicos

De los 10 estándares utilizados se encontraron ácido protocatecuico, hesperidina, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido siringico, ácido vainillinico, ácido phidroxibenzoico, ácido cafeico y ácido p-cumarico.

En el cuadro 6 se puede observar una mayor concentración de ácido protocatecuico en el tratamiento deshidratado (P<0.05) en relación al desecho de naranja fresca y ensilada; y que entre los tratamientos fresco y ensilado no hay diferencia (P>0.05). Con respecto al ácido clorogénico se observa que el deshidratado incrementó (P<0.05) este ácido fenólico al pasar de 0.0583 % cuando él desecho se encontraba fresco a 0.1893 % en el deshidratado. Con respecto al ensilaje se encontró que este compuesto se va incrementando, al incrementarse el tiempo de ensilado hasta alcanzar su valor máximo en el día 42, para posteriormente disminuir en el día 49. Hay ácidos que no muestran tendencia clara de incrementar o disminuir, esto es posible por las muy bajas concentraciones encontradas.

La hesperidina se va incrementando numéricamente durante el proceso de ensilaje, siendo en el día 28 donde se obtiene la mayor concentración (P<0.05) de igual manera el ácido gálico se va incrementando numéricamente hasta alcanzar su valor máximo en el día 35 (P<0.005). Aguiñiga-Sánchez et al. (2017) reportaron haber encontrado en S. edule var. nigrum spinosum algunos ácidos fenólicos, como ácido gálico, clorogénico, p-hidroxibenzoico, cafeico y p-cumárico (0.072, 0.823, 0.020, 0.091 y 0.032 mg / g de extracto, respectivamente) valores inferiores a los encontrados en este experimento, y que son capaces de contrarrestar el crecimiento de células cancerígenas en humanos. En estudios de Escobar et al. (2010)

obtuvieron 0.17 mg/g de hesperidina valor menor al encontrado en nuestra investigación. Los compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, antibacterianas y anticancerígenas (Shahidi y Chandrasekara, 2010; Arellano-González *et al.*, 2011). La fermentación se ha aplicado para aumentar el contenido de compuestos fenólicos bioactivos en las legumbres mejorando así su actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2008; Torino *et al.*, 2013).

Sun et al. (2014) citan que durante la fermentación aumentan la cantidad de fenólicos que es el resultado de una reacción de hidrolisis microbiana debido a la ruptura estructural de las paredes celulares de las plantas, lo que conduce a la liberación o síntesis de diversos compuestos antioxidantes. Covarrubias-Cárdenas et al. (2018) mencionan que durante su estudio en cáscara de naranja el mayor componente antioxidante que obtuvo fue el ácido gálico 4.095 % de peso seco en cáscaras de naranjas agrias frescas, valor superior al que se obtuvo en este trabajo y también reporta que el ácido clorogénico y el ácido cafeico fue menor, caso contrario en el presente trabajo ya que estos dos compuestos fenólicos fueron los más elevados en cáscara deshidratada.

Cuadro 6a. Promedios de ácidos fenólicos en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo.

Tratamiento	% Ácido Protocate- cuico en ms.	% Hesperi- dina en ms.	% Ácido Gálico en ms.	% Ácido Clorogénico en ms.	% Ácido Siringico en ms.
Deshidratado	0.8710 ± 0.036 <sup>a</sup>	7.441 ± 1.21 <sup>ab</sup>		0.1893 ± 0.0533 abc	0.0228 ± 0.0057 a
fresco	0.0516 ± 0.039 <sup>b</sup>	$7.864 \pm 1.32$ ab	$0.0032 \pm 0.0035$ bc	$0.0583 \pm 0.0581$ cd	0.0255 ± 0.0062 a
Ensilado 7 días	0.0410 ± 0.036 b	6.820 ± 1.21 <sup>ab</sup>	0.0025 ± 0.0032 bc	0.0120 ± 0.0533 <sup>d</sup>	0.0250 ± 0.0057 <sup>a</sup>
14 días	0.0453 ± 0.036 <sup>b</sup>	6.639 ± 1.21 <sup>ab</sup>	$0.0022 \pm 0.0032^{cd}$	$0.0125 \pm 0.0533^{d}$	$0.0195 \pm 0.0057$ ab
21 días	0.0454 ± 0.039 b	6.590 ± 1.32 ab	$0.0116 \pm 0.0035$ ab	$0.0733 \pm 0.0581$ bcd	0.0126 ± 0.0062 ab
28 días	0.0521 ±0.036 b	9.887 ± 1.21 a	$0.0109 \pm 0.0032$ abc	$0.1533 \pm 0.0533$ abcd	$0.0129 \pm 0.0057$ ab
35 días	0.0433 ±0.036 b	$7.383 \pm 1.21$ ab	0.0134 ± 0.0032 a	$0.2235 \pm 0.0533$ ab	0.0261 ± 0.0057 a
42 días	0.0543 ±0.036 <sup>b</sup>	8.391 ± 1.21 ab	$0.0109 \pm 0.0032$ abc	0.2271 ± 0.0533 a	$0.0150 \pm 0.0057$ ab
49 días	0.0491 ±0.036 b	5.800 ± 1.21 b		$0.1378 \pm 0.0533$ abcd	0.0048 ± 0.0057 b

<sup>&</sup>lt;sup>a, b</sup> Valores con distinta literal en cada columna indican diferencias (P<0.05), -- no se detectó.

Cuadro 6b. Continuación de promedios de ácidos fenólicos en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo.

Tratamiento	% Ácido Vainillinico en ms	% Ácido p- hidroxibenzoico en ms	% Ácido Cafeico en ms.	% Ácido P-cumarico en ms.
Deshidratado			0.00587 ± 0.0096 b	
fresco	0.00066 ± 0.0066 b	0.00014 ± 0.0028 °	0.02227 ± 0.0105 ab	0.00029 ± 0.0025 b
Ensilado 7 días		0.00139 ± 0.0025 bc	0.02926 ± 0.0096 ab	0.00833 ± 0.0022 a
14 días	$0.00646 \pm 0.0061$ ab	$0.00266 \pm 0.0025$ abc	0.03461 ± 0.0096 a	$0.00899 \pm 0.0022^{a}$
21 días 28 días	0.00055 ± 0.0066 b 0.02160 ± 0.0060 a	0.00806 ±0.0028 <sup>ab</sup> 0.00910 ± 0.0025 <sup>a</sup>	$0.00979 \pm 0.0105$ ab $0.01786 \pm 0.0096$ ab	$0.00427 \pm 0.0025^{ab}$ $0.01013 \pm 0.0022^{a}$
35 días	$0.00576 \pm 0.0060$ ab	$0.00467 \pm 0.0025$ abc	0.03411 ± 0.0096 a	$0.00817 \pm 0.0022^{a}$
42 días	$0.00877 \pm 0.0060$ ab	$0.00320 \pm 0.0025$ abc	0.03651 ± 0.0096 a	0.00881 ± 0.0022 a
49 días		$0.00366 \pm 0.0025$ abc	$0.01844 \pm 0.0096$ ab	$0.00464 \pm 0.0022$ ab

<sup>&</sup>lt;sup>a, b</sup> Valores con distinta literal en columna indican diferencias (P<0.05), -- no se detectó.

# 9.5.- Ácidos Flavonoides

De los 8 estándares utilizados, se encontraron: rutina, florizina, quercetina, naringenina y galangina. En el cuadro 7 se muestra que las concentraciones de los flavonoides encontrados en el análisis de cromatografía están en mínimas concentraciones. Los porcentajes de florizina y naringenina son similares (P>0.05) en naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo; mientras que la concentración de rutina, quercetina y galangina son similares entre el tratamiento fresco y deshidratado. Al comparar el efecto del ensilado en estos 3 compuestos se observó que la rutina no tiene una tendencia a través de los días de ensilado, mientras que la quercetina tiende a reducirse (P<0.05) durante el ensilado, y la galangina con diferencia del día 42 tiende a mantenerse estable. Aguiñiga-Sánchez et al. (2017) reportaron haber encontrado algunos ácidos flavonoides que están representados en la S. edule var. nigrum spinosum como son florizina, (0.005 y 1.556 mg / g de extracto) valores similares a los encontrados en este trabajo. Perez-Najera et al. (2013) reportan 14.32 mg quercetina/g ms en cáscara de lima; Escobar et al. (2010) obtienen 1.32 mg/g de naringenina en cáscara de naranja, valores superiores a los encontrados en nuestro trabajo.

Los flavonoides eliminan eficazmente los radicales hidroxilo y peroxilo, forman complejos con metales e inhiben la oxidación lipídica (Lee *et al.*, 2004). Sun *et al.* (2014) citan que durante la fermentación aumentan la cantidad de flavonoides que es el resultado de una reacción de hidrolisis microbiana debido a la ruptura estructural de las paredes celulares de las plantas, lo que conduce a la liberación o síntesis de diversos compuestos antioxidantes.

Xiao-Yu *et al.* (2017) mencionaron en su estudio de ensilado de hojas de trigo sarraceno con levaduras de *aspergillus niger*, haber encontrado rutina y quercetina, y que durante el ensilaje presentaba tres etapas que inicialmente aumentaba, luego disminuía y finalmente era relativamente estable y se lo atribuyen a una degradación de los compuestos por enzimas liberadas por *A. niger*.

Cuadro 7.- Promedios de ácidos flavonoides en desecho de naranja fresca, deshidratada y ensilada a diferente tiempo

Tratamiento	% Rutina en ms.	% Florizina en ms.	% Quercetina en ms.	% Naringenina en	%Galangina en ms.
				ms.	
Deshidratado	$0.0039 \pm 0.0008^{a}$	$0.0057 \pm 0.0408$	0.0114 ± 0.0019 <sup>a</sup>	$0.0183 \pm 0.0305$	$0.0407 \pm 0.0192$ b
Fresco	$0.0017 \pm 0.0009$ abc	$0.0047 \pm 0.0444$	$0.0064 \pm 0.0020$ ab	$0.0632 \pm 0.0333$	$0.0620 \pm 0.0210$ ab
Ensilado					
7 días	$0.0025 \pm 0.0008$ ab	$0.0156 \pm 0.0408$	$0.0080 \pm 0.0019$ ab	$0.0133 \pm 0.0305$	$0.0616 \pm 0.0192$ b
14 días	$0.0026 \pm 0.0008$ ab	0.0041± 0.0408	$0.0086 \pm 0.0019$ ab	$0.0429 \pm 0.0305$	$0.0580 \pm 0.0192$ b
21 días	$0.0007 \pm 0.0009$ bc	$0.0360 \pm 0.0444$	0.0046 ±0.0020 b	$0.0993 \pm 0.0333$	0.0598 ± 0.0210 b
28 días	$0.0006 \pm 0.0008$ bc	$0.1139 \pm 0.0408$	$0.0057 \pm 0.0019$ b	$0.0443 \pm 0.0305$	$0.0530 \pm 0.0192$ b
35 días	$0.0019 \pm 0.0008$ abc	$0.0246 \pm 0.0408$	$0.0050 \pm 0.0019$ b	$0.0636 \pm 0.0305$	$0.0541 \pm 0.0192$ b
42 días	$0.0002 \pm 0.0008$ °	$0.0169 \pm 0.0408$	$0.0066 \pm 0.0019$ ab	$0.0617 \pm 0.0305$	0.1150 ± 0.0192 a
49 días	$0.0010 \pm 0.0009$ bc	$0.0877 \pm 0.0444$	$0.0042 \pm 0.0020$ b	$0.0367 \pm 0.0333$	$0.0495 \pm 0.0210$ b

<sup>&</sup>lt;sup>a, b</sup> Valores con distinta literal en columna indican diferencias (P<0.05), -- no se detectó.

### 10.- Conclusión

Con respecto a los indicadores de fermentación, la concentración de ácido láctico y pH fueron mayores en el ensilaje, reportando que el ácido láctico se estabiliza al día 14 de ensilado y el pH al día 21. En la composición nutrimental con relación a MS el registró de promedios es mayor en deshidratado al sol; los promedios reportados de FDA se mantienen en deshidratado y fresco, dándose un incremento en el ensilado y estableciéndose a partir del día 21. Los promedios de FDN no presentan variación en deshidratado, fresco ni los primeros 21 días de ensilado, a partir del día 28 de ensilado se incrementa en un 3%.

En lo que respecta a PC los tratamientos de deshidratado y ensilado son los que presentan mayor promedio. El ensilar mejora la capacidad antioxidante al igual que él deshidratado; La exposición al sol de los desechos de naranja mejora la producción de vitamina C. En deshidratado, los ácidos fenólicos hesperidina, siringico y cafeico se mantienen en cantidades similares al fresco; sin embrago, el ácido protocatecuico y clorogénico aumentan con respecto al tratamiento fresco. En desecho de naranja ensilado los promedios de ácidos flavonoides no varían en ninguno de los tres tratamientos.

Se concluye que existe variación en el estado oxidativo y composición nutrimental entre los tres métodos de conservación, mientras que el tiempo óptimo recomendado de un ensilaje de desechos de naranja es a partir del día 28 que es cuando existe una estabilización en el proceso.

#### 11.- LITERATURA CITADA

- ♣ Abeysinghe D. C., Li X., Sun C. D., Zhang W., Zhou C., y Chen K. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. Food Chem. 104:1338-1344.
- Aguilar A. R. 2015. Determinación de la Calidad Nutritiva y la Digestibilidad In Vitro de la Materia Seca de opuntia rastrera y agave salmiana del Municipio de General Cepeda, Coahuila. Tesis de Ingeniería. División de Ciencia Animal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México.
- ♣ Aguiñiga-Sánchez I., Cadena-Íñiguez J., Santiago-Osorio E., Gómez-García G., Mendoza-Núñez V. M., Rosado-Pérez J., Ruíz-Ramos M., Cisneros-Solano V. M., LedesmaMartínez E., Delgado-Bordonave A. de J. y Soto-Hernández R. M. 2017. Chemical analyses and in vitro and in vivo toxicity of fruit methanol extract of Sechium edule var. nigrum spinosum. PHARMACEUTICAL BIOLOGY, 2017 VOL. 55, NO. 1, 1638–1645 Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/iphb20.
- ♣ Andersen O. M. y Markham K. R. 2006. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC, Taylor and Francis.
- ♣ Arrellano-González M. A., Ramírez-Coronel A., Torres-Mancera T., Perez-Morales G., Saucedo- Castañeda G., 2011. Antioxidant activity of caffe pulp extracts. Food Technolo. Biotechnol. 49 (3), 374- 378.
- ♣ Ashbell G. y Donahaye E.1984. Losses in Orange Peel Silage. Agricultural Wastes 11 (1984) 73-77. Agricultural Wastes 0141-4607/84/\$03.00 L Elsevier Applied Science Publishers Ltd, England, 1984. Printed in Great Britain
- ♣ Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2017. Official methods of analysis Ass. Off. Anal. Chem. 20 th Ed. Arlington, VA.
- ♣ Barros, H. R. M., Ferreira, T. A. P. C. y Genovese, M. I. 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. Food Chemistry, 134, 1892–1898. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.090
- ♣ Benzie I.F. y Strain J.J. Methods Enzymol 1999. 299:15-27.
- ♣ Bermúdez-Loaiza J. A., Melo-Camacho E. P., Estrada-Álvarez J. 2015. Evaluación de ensilaje de naranja entera (Citrus sinensis) como alternativa de suplementación

- en bovinos. Veterinaria y Zootecnia ISSN 2011-5415 Vol 9 No.2, junio diciembre de 2015. http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/v9n2a04.pdf
- ♣ Bocco A., Cuvelier M. E., Richard H., Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. Journal of Agricultural Food Chemistry. 46 (6): 2123-2129.
- ← Campos-Granados C. M. 2015. El impacto de los micronutrientes en la inmunidad de los animales. Nutrición Animal Tropical 9(1) 1-23.
- ↓ Casallas, A. O. A. 2014. Identificación y Evaluación de Especies Forrajeras Provisorias Integradas a Sistemas de Producción Animal. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Salle. Bogotá. Colombia.
- Cattani P., Bragachini M. y Peiretti J. 2010. El tamaño de picado como factor de calidad. sitio argentino de producción animal. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\_y\_manejo\_reservas/ reservas\_silos/141-picado.pdf
- ♣ Chilson J. M., Rezamand P., Drewnoski, Price W. y Hunt C. W. 2016. Effect of homofermentative lactic acid bacteria and exogenous hydrolytic enzymes on the ensiling characteristics and rumen degradability of alfalfa and corn silages. The Professional Animal Scientist, 32:598–604.
- ♣ Conde, A. 2009. Calidad nutricional de los subproductos de mango (Mangifera indica) optimización de un proceso para su conservación por ensilaje y su potencial en la alimentación de rumiantes. Universidad de la Sabana. p 141.
- Coppo, J. A. y Mussart, N. B. C. 2006. Artículo: Bagazo de citrus como suplemento invernal en vacas de descarte. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina
- Córdova J. M. S, Méndez M. M., Huerta C. R., Juárez M. Ma. de L. y Guerra L. J. E. 2010. Estrés oxidativo en gametos. Revista electrónica de Veterinaria 11 (07): 1-32.
  - https://www.researchgate.net/publication/45259326\_Estres\_oxidativo\_en\_gametos Oxidative stress in gametes Consultado 17 de diciembre 2019
- ♣ Covarrubias-Cárdenas A., Patrón-Vázquez J., Espinosa-Andrews H., Ayora-Talavera T., García-Cruz U. y Pacheco N. 2018. Antioxidant capacity and UPLC-PDA ESI-MS polyphenolic profile of *Citrus aurantium* extracts obtained by ultrasound assisted extraction. J Food Sci Technol. 2018 Dec; 55(12): 5106–5114.

- ♣ Cozzolino D., Fernández E. G., Restaino E. A., y La Manna A. 2006. Determinación de la composición química de heno mediante la Espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIRS). Revista Argentina de Producción Animal. 26(3): 203-209.
- Cruz H. J., Licea P. M. E., Hernández G. P., Marcel E. A. y Yanes Q. M. 2011. estrés oxidativo y diabetes mellitus. Rev. Mex Patol Clin 58 (1): 4 15.
- ♣ Davico C., Polleta GL., Loteste A Scangnetti JA., Campana M., Parma MJ. y SImoniello MF, 2012. Evaluación del estrés oxidativo en juveniles de Prochilodus lineatus expuestos a cipertremia. REV. FABICID 16:157-166.
- ♣ De la Rosa D. B. 2005. El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. IV Jornada de alimentación animal. Laboratorio de Mourisca de Lollín (Puntepiedra). Recuperado de: http://www.mouriscade.com/doc\_ponencias/oct2005/ensilado\_zonas\_humedas\_e\_in dicadores\_calidad.pdf
- ♣ Driehuis F. y Oude E. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. The veterinary quarterly. 22(4): 212-216.
- ♣ Dunière L.; Sindou J.; Chaucheyras-Durand F. 2013. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. Animal Feed Science and Technology, 182: 1-15.
- ♣ Escamilla J. Ch. I., Cuevas M. E. Y., Guevara F. J.2009. Monografia Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM Vol. 52 No. 2 marzo-abril.
- ♣ Escobar M., Hernández H. Y., Barragán B. E. 2010. Extracción de compuestos fenólicos de cáscaras de cítricos producidos en México (naranja valencia, naranja agria, limón mexicano, limón real, mandarina, toronja y lima). XVIIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. VII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Acapulco, Guerrero, México.
- ♣ FAO. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. 2017. Citrus Fruit - Fresh and Processed Statistical Bulletin 2017. http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf
- FEN Federacion Española de Naranja. 2011 www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/naranja.pdf, 2011. Consultado: 24 de octubre del 2017

- ♣ Fernández M. A. 2015. Engormix.com. Parte del libro: Transformación de subproductos y residuos de agroindustria de cultivos templados, subtropicales y tropicales en carne y leche bovina de Aníbal Fernández Mayer. www.produccionanimal.com.ar
- ♣ Fernández L. R. 2017. Potencial de Producción y Calidad Nutricional de 10 Híbridos de Maíz Forrajero en la Comarca Lagunera. Tesis de Ingeniería. División de Carreras Agronómicas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila. México.
- ♣ Ferreira S. S.; Silva A. M.; Nuñes F. M. 2018.Citrus reticulata Blanco peels as a source of antioxidant and anti-proliferative phenolic compounds. Industrial Crops and Products, 111 (10): 141-148.
- ♣ Filippi, R.2011. Conceptos básicos en la elaboración de ensilajes. Universidad de la Frontera. Chile. P.1-95 http://www.praderasypasturas.com/files/menu/catedras/praderas\_y\_pasturas/2009/ 32-Ensilaje-Conceptos-Basicos.pdf
- ♣ Fox B. A. y Camerón A. G. 2002. Ciencia de los alimentos nutrición y salud. México D.F. 170: 176 -177.
- ♣ 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.
- ♣ Garcés M. A., Suárez E. J. G. y Ruíz S. 2006. Evaluación de la calidad bromatológica del ensilaje de pasto kikuyo y maní forrajero. Revista Lasallista de Investigación. Corporación Universitaria Lasallista, 3 (2): 34-37
- → Gollop N., Zakin V. y Weinberg Z. 2005. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. Journal of Applied Microbiology, 98: 662-666.
- ♣ Gómez Cruz A. M. y Schwentesis Rindermann R. 1997. La agroindustria de naranja en México. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM) de la Universidad Autónoma Chapingo, km. 38.5 carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Chapingo, México. Teléfono y Fax: 91 (595) 502-7.
- González P. N. E. 2007. Elaboración de galletas con harina de bagazo de naranja. Tesis de titulación de Licenciatura de Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- ♣ González-Torres M. C., Betancourt-Rule M. y Ortiz-Muñiz R. 2010. Daño Oxidativo y Antioxidantes. Bioquimia, 25(1),3-9. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=576/57611797001 Consulta 18 de Diciembre de 2019
- ♣ Goulas V. y Manganaris G.A. 2012. Exploring the phytochemicals content and the antioxidant potencial of Citrus fruits grown in Cyprus. Journal of Food Chemistry. 131: 39-47
- ♣ He R., Ju X., Yuan J., Wang L., Girgih A. T. y Aluko R. E. 2012. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. Food Research International, 49(1), 432–438.
- ♣ Hernández J., Rojo R., Salem A. Z. M., Mirzaei F., González A. y 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.
- Hicks J. J., Torres-Ramos Y. T., Sierra-Vargas M. P. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. Revista de Endocrinología y Nutrición Vol. 14, No. 4 Octubre-Diciembre 2006 pp 223-226 https://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2006/er064b.pdf Consultada 1 de diciembre 2019.
- ♣ Huerta J. M., Ortega C. Ma. E., Cobos P. M., Herrera H. J. G., Díaz C. A. y Guinzberg P. R. 2005. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domesticos. Asociacion Interciencia 30 (12): 728-734. https://www.redalyc.org/pdf/339/33911102.pdf consultado 18 de diciembre 2019
- ↓ Ielpo M.T.L., Basile A., Miranda R., Moscatiello V., Nappo C., Sorboet S. 2000. Immunopharmacological properties of flavonoids. Fitoterapia. 71: S101-S109
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED), 2017 http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM20oaxaca/municipios/20067a.ht ml
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agricolas y Pecuarias (INIFAP). 2009. Cultivo de los Cítricos en el Estado de Nuevo León. Libro Científico No. 1 Consultado: 25 de agosto 2019. http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/830.pdf
- ♣ Isaza M. Y. L., Restrepo M. D. A y López J. H. 2013. Oxidación lipídica y antioxidantes naturales en derivados cárnicos. J. Eng. Technol. 2 (2): (2013) ISSN: 2256-3903 pag. 56

- https://pdfs.semanticscholar.org/a825/7dad08f0ecff04a3e307c479ba02fc1e6fa0.pd f
- ♣ Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., Ito C. y Furukawa, H. 2000. Quantitative study of flavonoids in leaves of citrus plants. Journal Agriculture Food Chemistry. 48(9): 3865-3871.
- ♣ Kinberley A. y Taylor C. (1996). A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Applied Biochemistry and Biotechnology, 56: 49-54.
- ♣ Kono I. y Himeno K. 2000. Changes in gamma-aminobutyric acid content during beni-koji making. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 64(3), 617–619
- Kwak H.S., Jeong Y. y Kim M. 2018. Effect of Yeast Fermentation of Green Coffee Beans on Antioxidant Activity and Consumer Acceptability. Hindawi Journal of Food Quality Volume 2018, Article ID 5967130, 8 pages https://doi.org/10.1155/2018/5967130
- Lee J., Koo N. y Min D. B. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3(1), 21–33.
- Lee I. H., Hung Y.-H., y Chou, C.-C. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 150−156.
- ↓ Lin C., Bolsen KK., Brent BE, y Fung DYC. 1992. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. J Applied Bacteriol; 73:375-387
- ♣ Llancari A. y Matos A. 2011. Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria. En: Universidad Peruana Unión. I Congreso Nacional de Investigación. Perú, Lima.

- ↓ López Z. J. 2007. Elaboración y validación de una dieta balanceada para la engorda de ovinos, a partir de harina de bagazo de naranja. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- ↓ López L. A., Fernando A. C., Lazarova Z., Bañuelos V. R., Sánchez R. S. H. 2012. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. REVISTA ANACEM. VOL.6 N°1 https://www.researchgate.net/profile/Argelia\_Lopez-Luna/publication/264233113\_Antioxidantes\_un\_paradigma\_en\_el\_tratamiento\_de\_enfermedades/links/53d53f600cf228d363ea0852/Antioxidantes-un-paradigma-en-el-tratamiento-de-enfermedades.pdf Consultado 18 de diciembre 2019.
- ↓ López, L. C. C. 2014. Contenido de Carbohidratos Estructurales y no Estructurales, Proteína y NDT en Dietas a Base de Heno de Alfalfa (*Medicago sativa*) y Concentrado para Ovinos. Tesis de Ingeniería. División de Ciencia Animal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México.
- ♣ López L., Ortega A. y Lozada J. 2015. Modificaciones enzimáticas de compuestos fenólicos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 9(1), 5-14. Consultada: 31 de Octubre de 2019. 
  http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castro-Lopez-et-al-2015.pdf
- ↓ Lu Y. y Guo X. 2019. The Effect of Light in Vitamin C Metabolism Regulation and Accumulation in Mung Bean (Vigna radiata) Germination. Plant Foods for Human Nutrition https://doi.org/10.1007/s11130-019-00787-x.
- Martínez M.J. 2008. Características nutritivas de los hollejos húmedos de naranja (Citrus sinensis cv. Valencia) mantenidos en estibas. Téc Pecu-México, 46 (2): 183-193,
- Mayer A. F. 2015. Subproductos de los Cítricos. Transformación de subproductos y residuos de agroindustria de cultivos templados, subtropicales y tropicales en carne y leche bovina de Anibal Fernandez Mayer Sitio Argentino de Producción Animal. www.produccion-animal.com.ar
- ♣ Mayor O. R. 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Rev. Inst. Med. Trop. 5 (2): 23 29.
- Mazza, G. 2000. Alimentos Funcionales. Aspectos Bioquímicas y de Procesado. Zaragoza, España. pp. 158-178.
- ♣ McDonald, P., Henderson, A.R. y Heron, S.J.E. 1991. The Biochemistry of Silage. 2nd ed. Marlow, UK: Chalcombe Publications.

- ♣ McDowell L. R. 2002. Recent advances in minerals and vitamins on nutrition of lactating cows. Pakistan Journal of Nutrition. 1(1): 8-19.
- Melo-Camacho Edna Paola, Bermúdez-Loaiza Jaime Alberto, Estrada-Álvarez Julián.2017. Ensilaje de naranjas enteras (*Citrus sinensis*) como suplemento para alimentación de rumiantes. Veterinaria y Zootecnia ISSN 2011-5415. 11 (1), enero junio de 2017.
- Merken, H.M. y Beecher, G.R., 2000. Measurement of Food Flavonoids by HighPerformance Liquid Chromatography: A Review. Journal of Agricultural Food Chemistry. 48: 578-599
- Merry, R.J., Lowes, K.F., y Winters, A. 1997. Current and future approaches to biocontrol in silage. p. 17-27, in: Jambor et al., 1997, q.v.
- ♣ Muck, R.E. 2013. Recent advances in silage microbiology. Agr. Food Sci. 22: 315.
- Navarro G. I., Periago M. J., Garcia A. F. J. 2017. Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. Rev Esp Nutr Hum Diet. 2017; 21(4): 321. Consultada 30 de Octubre 2019. renhyd.org/index.php/renhyd/article/view/357/290
- ♣ NMX-FF-027-SCFI-2007. Productos Alimenticios no Industrializados para Consumo Humano –Fruta Fresca- Naranja (citrus sinensis Osbeck) Especificaciones.
- ♣ Ochoa C.I. y Ayala A. A. 2004. Los Flavonoides: Apuntes generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. Ingeniería y competitividad, 6: 93-104
- ♣ Pastene E. 2009. Estado Actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. Boletín Latinoam Caribe Plantas Med Aromaticas; 8 (6), pp. 449-55.
- ♣ Pedraza R. M., Pérez C R., León G. M., González P. C. E., Guevara V. G. E. y Martínez S. S. J. 2006. Valor nutritivo in vitro de ensilajes de hollejo fresco de cítrico (*Citrus sinensis*) con bagacillo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Rev. prod. anim., 18 (2): 95-98, Universidad de Camagüey, Cuba. https://www.researchgate.net/publication/331993282\_Valor\_nutritivo\_in\_vitro\_de\_e nsilajes\_de\_hollejo\_fresco\_de\_citrico\_Citrus\_sinensis\_con\_bagacillo\_de\_cana\_de\_azucar\_Saccharum\_officinarum
- ♣ Peñarrieta J. M., Tejeda L., Mollinedo P., Vila J. L., Bravo J. A. 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos Revista Boliviana de Química, vol. 31, núm.

- 2, julio-diciembre, 2014, pp. 68-81 Universidad Mayor de San Andrés La Paz, Bolivia https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf consultada: 09 de enero de 2020.
- Perez-Jiménez J. y Saura-Calixto F. 2007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. V Congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones
- ♣ Pérez-Najera V.C., Lugo-Cervantes E.C., Gutiérrez-Lomelí M. y Del-Toro-Sánchez C.L. 2013. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta Risso*) y determinación de su actividad antioxidante. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud www.biotecnia.uson.mx Volumen XV, Número 3 : 18-22
- Piquer O., 2006. Whole Citrus Fruits in Sheep Nutrition. PhD. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (Spain).
- ♣ Piquer O., Ródenas L., Casado C., Blas E. y 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.
- ♣ Pliego P. K. 2018. Suplementación de vitamina C protegida para mejorar la reproducción y reducir el estrés oxidativo en ovejas. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- ♣ Porras-Loaiza A. P. y López-Malo A. 2009. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 3 1 (2009): 122. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. San Andrés Cholula Pue. México. Consultada 30 de octubre 2019. https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf
- ♣ Ramful D., Bahorun T., Bourdon E., Tarnus E., Aruoma O.I. 2010. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potencial prophylactic ingredients for functional foods application. Toxicology, 278: 75-87
- Ramírez M. J. S. 2016. Composición Química de Ensilados de Pasto Maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*). Fertilizado con Triple 17 Inoculado con SIL- ALL 4X4®. Tesis de Ingeniería. División de Ciencia Animal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México.
- ♣ Ramírez H. J. H., García F. C. F., Vizcaíno R. J. A., Cárdenas J. M., Gutiérrez C. F. J., Mariel M. H. y Villagrán R. S. 2012. ¿Qué son y para qué sirven

los antioxidantes? Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Volumen XXV Número 2.

https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num2/articulos/antioxidantes/

- ♣ Rincón A. M., Vásquez A. M., Padilla F. C. 2005. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (citrus sinensis), mandarina (citrus reticulata) y toronja (citrus paradisi) cultivadas en Venezuela. Archivos Latinoamericano de Nutrición. 55:3
- ♣ Rodrigo R., Miranda A. y Vergara L. 2011. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. Clinica Chimica. Acta. 2011, 412 (5): 410-424.
  - http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/123283/Rodrigo\_Ramon.pdf?seque nce=1&isAllowed=y
- Rodríguez P., Córdova J., Castillo G. y Lugo E. 2006. Efecto de la fermentación sólida sobre la liberación de compuestos fenólicos y flavonoides e incremento de la actividad antioxidante en cáscara de Citrus limetta Risso, utilizando Aspergillus saitoi. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. pp 1.
- ♣ Rojas-Barquera D., Narváez-Cuenca C.E. 2009. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava L.*) cultivadas en Colombia. Quim. Nova, 32 (9): 2336-2340
- Ross J. A. y Kasum C. M. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. Annu Rev Nutr, 22:19-34.
- ♣ Ruiz O., Beltrán R., Salvador, F, Rubio H., Grado A. y Castillo Y. 2006. Valor nutritivo y rendimiento forrajero de híbridos de maíz para ensilaje. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 40 (1): 91-96.
- ♣ Salinas-Ríos T., Sánchez-Torres E. M. T., Díaz-Cruz A., Cordero-Mora J. L., Guinzberg-Perrusquìa R., Rabanales-Morales J. I., Figueroa-Velasco J. L. y Hernández-Bautista J. 2017. Oxidative state of ewes with different number of parity during gestation and lactation. Pesquisa Veterinaria Brasileira 37 (12): 1405-1410,
- ♣ Santander-M M., Osorio O. y Mejia-España D. 2017. Evaluación de propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de una bebida mixta durante almacenamiento refrigerado. Rev. Cienc. Agr. 34(1): 84-97. http://www.scielo.org.co/pdf/rcia/v34n1/v34n1a07.pdf consultado: 17 de diciembre de 2019.

- ♣ Santini, F. J. 2014. Conceptos Básicos de la Nutrición de Rumiantes. Área de Investigación en Producción Animal. Grupo de Nutrición Animal. INTA, EEA Balcarce. (2014, Mayo 14). Nutrición animal aplicada.
- ♣ SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020.

  http://infosiap.siap.gob.mx/opt/agricultura/intension/Intencion\_cosechaPerenne\_cultivo2020.pdf Consultado mayo 2020.
- Shafiya R., Rajkumari K., Sofi S. A., Bashir N., Nazir F. y Ahmad G. N. 2016. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. J. Saudi Society Agric.l Sci. 24:1-8.
- ♣ Shahidi, F. y Chandrasekara, A., 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. Phytochem. Rev. 9, 147–170, http://dx.doi.org/10.1007/s11101-009-9142-8.
- Sun J. H., Seung Y. L., Young-Chan K., Inwook C., Geun-Bae K. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. Food Chemistry 160 346 356. journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem
- ♣ Torino M. I., Limón R. I., Martínez-Villaluenga C., Mäkinen S., Pihlanto A. y Vidal-Valverde C. 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. Food Chemistry, 136(2), 1030–1037.
- ♣ Torres R. J. C. 2017. Comportamiento productivo de corderos alimentados con niveles crecientes de pulpa de naranja y efecto antioxidante en la carne. Tesis de Doctorado Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- ♣ Thilakarathna S.H. y. Rupasinghe H.P. 2013. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. Nutrients, 5: 3367-3387.
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) 2020. http://rayenari.igeofcu.unam.mx/mexico/unam.html
- ↓ Valenzuela V. C. y Pérez M. P. 2016. Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos cárneos. Rev Chil Nutr. 43 (2). https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v43n2/art12.pdf
- ↓ Valencia C. A., Hernández B. A. y López de B. L. 2011 El ensilaje: ¿qué es y para qué sirve? Rev. de Divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Mayo-Agosto. Volumen XXIV, Número 2. 
  https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num2/articulos/ensilaje/

- ↓ Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2<sup>a</sup> Edicion. Editorial Cornell University Press. Ithaca.N.Y.
- ♣ Van Soest, P. T., Robertson JB., Lewis, BA. 1991. Métodos de fibra dietética, detergente neutro, de fibra, y los polisacáridos sin almidon en relación a la alimentación animal. Journal of Dairy Ciencia. 74: 10, 3583-3597.
- ♣ Volanis, M.; Zoiopoulos, P. y Tzerakis K. 2004. Effects of feeding ensiled sliced oranges to lactating dairy sheep. Small Ruminant Research, 53: 15-21.
- ➡ Wattiaux, M., 2003. Introducción a la preservación por ensilaje. Instituto de Babcock. Universidad de Wisconsin. Consultado 15 enero 2020. http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/wde/silage.es.pdf.
- ♣ Weinberg, Z.G. y Muck, R.E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. FEMS Microbiol. Rev., 19: 53-68.
- ↓ Xiao-Yu Z., Jiang Chen, Xue-Li L., Kang Yi, Yang Ye, Gang Liu, Shu-Fang Wang, Hui-Ling Hu, Liang Zou y Zhan-Guo Wang. 2017. Dynamic changes in antioxidant activity and biochemical composition of tartary buckwheat leaves during Aspergillus niger fermentation. Journal of Functional Foods 32 (2017): 375–381.