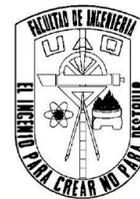




Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Doctorado En Ingeniería de Biosistemas



# Alimentación de cabras (*Capra hircus*) estabuladas con dietas para modificar el contenido de Bioactivos en leche, benéficos para el humano

## Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Florencia Muñoz Salinas

Dirigido por:

Dr. Irineo Torres Pacheco

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Enrique Rico García  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Luis Miguel Contreras Medina  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Rosalía Ocampo Velázquez  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro. Enero, 2023

## RESUMEN

La leche de cabra es alimento relevante por la calidad y cantidad de sus proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales y porque se degrada significativamente más rápido y es menos alergénica que la leche de vaca, puede aún ser mejorado su contenido de nutraceuticos. La alimentación que tenga el rumiante, incide en ese sentido y la alfalfa (*Medicago sativa L.*) puede hacer la contribución esperada, pero su impacto dependerá de las condiciones de crecimiento de la planta. Justamente, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), puede determinar condiciones de crecimiento y desarrollo en las plantas mediante la práctica de elicitación controlada. El  $H_2O_2$  es una especie reactiva de oxígeno (ERO) que juega un rol en la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico, activando o apagando rutas del metabolismo especializado implicado en la producción de metabolitos secundarios. Con fundamento en lo que se ha esbozado brevemente, en este proyecto se tuvo como objetivo final mejorar la calidad de la leche de cabra. La acción primera fue determinar un tratamiento aplicando  $H_2O_2$ , variando dosis y número de aplicaciones. De un total de 16 tratamientos, considerando el comportamiento de variables fisiológicas y bioquímicas, se seleccionó la dosis de 294 mM aplicada en tres ocasiones. Con la alfalfa así tratada, se alimentaron cabras de la raza Alpino Francés, con los respectivos controles. Las variables cuyo comportamiento fue evaluado en las cabras fueron las siguientes: células somáticas, volumen de leche producido, consumos de alfalfa y agua. En la leche se determinó el comportamiento de las variables bioquímicas como capacidad antioxidante, fenoles totales, taninos. Los resultados en esta etapa final sugieren que en la cabra y de acuerdo a las variables evaluadas no se observaron diferencias significativas respecto a los animales que no recibieron alfalfa elicitada. La leche tuvo un contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante significativamente mayor al grupo de cabras que no recibieron alfalfa elicitada. Lo antes mencionado impacta en el carácter nutraceutico de la leche y por consiguiente mayor antioxidantes en el organismo del consumidor.

## ABSTRACT

Goat milk is a relevant food due to its quality and quantity of proteins, carbohydrates, fats, vitamins, and minerals. Goat milk degrades significantly faster and is less allergenic than cow's milk. It can still be better by increasing its content of nutraceuticals. The diet of the ruminant has an impact in this sense, and alfalfa (*Medicago sativa L.*) can make the expected contribution, but its impact will depend on the growth conditions of the plant. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) can determine growth and development conditions in plants through controlled elicitation.  $H_2O_2$  is a reactive oxygen species that play a role in the response of plants to biotic and abiotic stress, activating or shutting down specialized metabolic pathways involved in the production of secondary metabolites. Based on what has been briefly outlined, in this project, with the final objective of improving the quality of goat milk, it focused first on determining a treatment based on  $H_2O_2$ , managing doses, and some applications. From a total of 16 treatments of which, based on the behavior of physiological and biochemical variables, the amount of 294 mM applied on three occasions was selected. We were fed French Alpine breed goats with the treated alfalfa and the respective controls. The variables evaluated in the goats were: somatic cells, the volume of milk produced, consumption of alfalfa, and water. We determined biochemical variables in milk such as antioxidant capacity, total phenols, and tannins. The results in this final stage suggest that in the goat and according to the evaluated variables, no significant differences were observed concerning the animals that did not receive elicited alfalfa. Regarding the milk, it had a content of total phenols and antioxidant capacity significantly higher than the group of goats that did not receive elicited alfalfa. It impacts, as mentioned earlier, the nutraceutical nature of milk. Therefore, more antioxidants in the consumer's body.

**GRACIAS....., GRACIAS....., GRACIAS.**

*Gracias DIOS por la VIDA y la oportunidad.*

*MAMÁ gracias por ser la primera en ayudarme a contar plantitas.*

*PAPÁ gracias por destruir tu parcela para construir la mía.*

*Gracias a los que ayudaron a que se lograra este proyecto. LO LOGRE!!!.*

“La cosa ya había tomado forma en mi mente antes de empezarla. Los primeros intentos fueron absolutamente insoportables. Digo esto porque quiero que sepas que si ves algo valioso en lo que estoy haciendo, no es accidental sino debido a una dirección y a un propósito verdadero”.

*Vincent Van Gogh*

*El Ritmo de la Vida*

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
I. Introducción	9
II. Antecedentes	11
II.1 Ganadería Caprina	11
II.2 Producción Caprina	11
II.3 Generalidades de la leche de cabra	13
II.3.1 Condición funcional y nutracéutica de la leche de cabra	14
II.3.2 Beneficios nutricionales de la leche de cabra	15
II.3.3 Bioactivos en la leche de cabra	16
II.4 Alimentación de cabras	17
II.5 Alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> )	18
II.5.1 Periodo de cosecha	19
II.5.2 Metabolitos secundarios	20
II.6 Estrés abiótico con peróxido de hidrógeno	21
III. Hipótesis	23
IV. Objetivos	23
General	23
Específicos	23
V. Materiales y Métodos	24
Estrategia metodológica del objetivo I	25
Evaluación de diferentes tratamientos de peróxido de hidrógeno (Fase 1)	25
Área experimental	26
Medición de las variables longitud de tallo y cantidad de agua	26
Evaluación del perfil metabólico en el forraje	26
Evaluación de forraje elicitado con peróxido de hidrógeno (Fase 2)	28
Diseño experimental para evaluación de forraje elicitado	29
Evaluación del efecto xenohórmico en las cabras	30
Evaluación del potencial xenohórmico de la leche de cabra	30

	<b>Página</b>
VI. Resultado y Discusión	31
Determinación del impacto metabólico inducido por la elicitación en el forraje	31
Variables fisiológicas	31
Variables metabólicas	34
Capacidad antioxidante (ABTS y DPPH)	36
Enzimas antioxidantes	37
Taninos condensados	39
Efecto xenohórmico en las cabras alimentadas con forraje elicitado	40
Consumo de alfalfa	40
Consumo de agua	41
Células somáticas	41
Volumen de leche producido	42
Potencial xenohórmico de la leche de cabras alimentadas con forraje elicitado	43
Fenoles totales	43
Taninos condensados	44
Capacidad antioxidante (ABTS y DPPH)	46
VII. Conclusiones	48
VIII. Perspectivas	48
IX. Referencias Bibliográficas	49
X. Anexos	62

<b>Índice de Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Área experimental para el cultivo de alfalfa	26
Figura 2. Longitud de tallo en alfalfa	33
Figura 3. Cantidad de agua en la planta de alfalfa	34
Figura 4. Capacidad antioxidante (ABTS) en alfalfa	36
Figura 5. Capacidad antioxidante (DPPH) en alfalfa	36
Figura 6. Enzima antioxidante Fenilalanina amonoliasa (PAL) en alfalfa	38
Figura 7. Enzima antioxidante Catalasa (CAT) en alfalfa	38
Figura 8. Enzima antioxidante Superóxido dismutasa (SOD) en alfalfa	38
Figura 9. Taninos condensados en alfalfa	39
Figura 10. Consumo de alfalfa (Kg) de animales en experimentación	40
Figura 11. Consumo de agua (L) de animales en experimentación	41
Figura 12. Diferencia de células somáticas de animales en experimentación	42
Figura 13. Volumen de leche (L) de animales en experimentación	43
Figura 14. Fenoles totales en leche de cabra de animales en experimentación	44
Figura 15. Taninos en leche de cabra de animales en experimentación	46
Figura 16. Capacidad antioxidante de leche de cabra (DPPH) de animales en experimentación	47
Figura 17. Capacidad antioxidante de leche de cabra (ABTS) de animales en experimentación	47
Figura 18. Fenoles totales en alfalfa elicitada a 294 mM de peróxido de Hidrógeno	62
Figura 19. Flavonoides en alfalfa elicitada a 294 mM de peróxido de hidrógeno	63
Figura 20. Taninos condensados en alfalfa elicitada a 294 mM de peróxido de hidrógeno	63

## Índice de Cuadros

## Página

Cuadro 1. Principales estados productores de carne y leche caprina

12

Cuadro 2. Tratamientos para elicitación de alfalfa

25

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles (ENT) constituyen la principal causa de muerte a nivel mundial, ya que provocan más defunciones que las demás y afectan en mayor medida a las poblaciones de ingresos bajos y medios. Los datos referentes a la mortalidad y a la morbilidad revelan el impacto creciente y desproporcionado de la epidemia en los entornos con escasos recursos. Las cardiopatías están relacionadas con un consumo elevado de grasas saturadas y ácidos grasos tipo trans. El consumo de alimentos de esas características está creciendo rápidamente en entornos con escasos recursos. Se estima que la hipertensión causa 7,5 millones de muertes, lo que representa alrededor del 12,8% del total; y ese es un factor de riesgo muy importante de las enfermedades cardiovasculares, sobrepeso y obesidad (OMS, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, es de interés saber que la leche de cabra y sus derivados está ganando interés debido a la calidad y cantidad de sus proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas, minerales y sus propiedades funcionales (Albenzio et al., 2016). Otra de sus características es el contenido de nutraceuticos tales como compuestos fenolicos; estos nutrientes ayudan a la salud del consumidor y la alimentación que reciba la cabra puede modificar su cantidad (Chávez-Servín et al., 2018). Se ha reportado que los sistemas de alimentación en rumiantes, como las cabras, afectan la composición de la leche y pueden influir en la actividad antioxidante y los compuestos nutraceuticos de la misma (Keles et al., 2017).

Dentro del enfoque de la alimentación de las cabras, es útil referir que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es un compuesto químico capaz de generar estrés oxidativo e inhibir funciones de las plantas como ERO. Dicha especie también es generada como metabolito secundario en el metabolismo aerobio (Cheeseman, 2007). Recientes investigaciones han mostrado que el peróxido de hidrógeno también puede actuar como una molécula de señalización en plantas estimulando funciones biológicas y reacciones bioquímicas a concentraciones de nanomoles, regulando el crecimiento y desarrollo de

las plantas (Nazir et al., 2019 a, b; 2020). Mientras en niveles elevados, esta molécula puede ocasionar la muerte celular por medio de la oxidación de moléculas orgánicas (Htet et al., 2019). El peróxido de hidrógeno actúa como elicitador contrarrestando el estrés causado por factores ambientales tales como el estrés al cobre en *Solanum lycopersicum* (Nazir et al., 2019a). Además, existen reportes que demuestran que el peróxido de hidrógeno está involucrado en la transducción de señales que inducen la expresión de genes que mejoran la adaptabilidad de las plantas bajo condiciones de estrés (Khan et al., 2018). El objetivo del trabajo se basa en determinar la dieta de cabras mediante forraje elicitado que incremente el contenido de bioactivos en leche, potenciando así los efectos benéficos para el ser humano.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Ganadería caprina

Desde hace 10 mil años el ganado caprino tuvo relación con el hombre por medio de actividades de comercio e intercambio, características que representan a la cabra como una especie resistente al medio, con capacidad de adaptación con sus más de 300 razas existentes en la actualidad (Naderi et al., 2007). A finales del siglo XV, en el segundo viaje de Cristóbal Colón fue cuando las cabras ingresaron al continente americano. Las primeras cabras traídas de España provenían de Granada, Murcia y Málaga conocidas como razas criollas. En 1955 se introduce ganado caprino de Estados Unidos, ocasionando que razas criollas sean desplazadas por razas especializadas (Mellado, 1997).

Las cabras son rumiantes estacionales únicos debido a su capacidad de sobrevivir y reproducirse en condiciones desfavorables, en los cuales los procesos de rumia y fermentación son fundamentales (Muñoz-Salinas, 2016). Existen más de 60 razas de cabras reconocidas y más de 211 variedades de cabras en todo el mundo. Solo por mencionar algunas de las razas se tienen: Criolla, Murciana Granadina, Toggenburg, Boher, Saanen, Nubia, Alpina (INIFAP, 2008).

### II.2 Producción caprina

La leche de cabra ocupa el tercer lugar en la producción a nivel mundial después de la leche de vaca y búfala (FAO, 2016). El 85% de la producción de leche en el mundo es derivada de ganado bovino y después están otras especies tales como búfala (11%), cabra (2.3%), borrega (1.4%) y camello (0.2%) (FAO, 2015). Sin embargo, la producción de leche de pequeños rumiantes, incluyendo borregas y cabras han crecido en los últimos años, debido a los nuevos mercados consumidores (Selvaggi et al., 2014a). La producción de leche es más del doble en décadas recientes con una

tendencia para el 2030 de 53% (Pulina et al., 2018). Los países que producen más leche de cabra son India, Bangladés y Pakistán en Asia, en África son Sudán, Sudán del Sur y Somalia; Francia, España y Grecia son los mayores productores en Europa. Sin embargo, en América la producción de leche de cabra ha mostrado un incremento sustancial en años recientes. En 2016, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) reportó aproximadamente 1 millón de cabras alrededor del mundo con una producción de leche de 15.2 millones de toneladas (FAO, 2018).

La producción de leche caprina representa una contribución significativa a la economía rural, tiene un papel trascendente en la cadena alimenticia de las comunidades y representa un medio de sustento, principalmente para los pequeños productores. En el cuadro 1 se muestran los diez estados de la República Mexicana donde se concentra casi el 80% de la población caprina nacional con su respectiva producción leche (SIAP, 2011).

<b>Estado</b>	<b>Leche (miles de L)</b>
Coahuila	44,849
Guanajuato	42,326
Durango	25,419
Jalisco	9,348
Chihuahua	7,524
Zacatecas	6,205
San Luis Potosí	5,156
Nuevo León	4,065
Michoacán	3,993
Baja California Sur	3,974
Querétaro	2,590
Veracruz	2,320

Tlaxcala	2,231
Puebla	1,962
<b>Total Nacional</b>	<b>163,376</b>

Cuadro 1. Principales estados productores de carne y leche caprina (SIAP, 2020).

### II.3 Generalidades de la leche de cabra

La leche de cabra es un alimento con alto valor nutricional, fácil digestibilidad e hipoalergenicidad, siendo un sustituto adecuado para la lactancia materna (Clark y Mora, 2017). La leche puede ser considerada como una opción para reemplazar productos tradicionales y mejorar la salud humana especialmente para gente que sufre de intolerancia a la lactosa y problemas de alergia a la leche de vaca (Gobba et al., 2014; Formiga de Sousa et al., 2015). En los Estados Unidos y otros países en desarrollo, la leche de cabra es consumida por gente con intolerancia a la leche de vaca y por desórdenes digestivos (Pulina et al., 2018), debido a que es degradada significativamente más rápido por jugos gástricos y duodenales que la leche de vaca (Almaas et al., 2006).

La leche de cabra es una mezcla compleja de distintas sustancias, presentes en suspensión, emulsión y solución. En su composición presenta sustancias definidas como agua, grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales denominado extracto seco o sólidos totales. Estos varían dependiendo de factores como la raza, el tipo de alimentación, el medio ambiente y el estado sanitario de los animales (Agudelo y Bedoya, 2005). Los productos lácteos de cabra no son ricos en grasa saturada, son más digeribles, son saludables para muchas enfermedades gastrointestinales y son menos alergénicos que la leche de vaca (Orman et al., 2011).

La leche de cabra tiene sabor desagradable derivada de los ácidos caprílico, caprico, caproico presentes en su leche y en productos de leche limitando la aceptación de los consumidores y el desarrollo de productos de leche (Ranadheera et al., 2018). La leche

de cabra contiene mayor cantidad de vitamina A, (2.074 UI) comparada con la leche de vaca (1.560 UI), lo cual ocurre debido a que los caprinos convierten todo el caroteno en vitamina A, razón por la cual es más blanca que la leche de vaca. Adicionalmente la leche de cabra es una fuente rica en riboflavina (actúa como factor de crecimiento) y niacina alcanzado un 350% más de niacina que la leche de vaca (Park, 2006).

### II.3.1 Condición funcional y nutracéutica de la leche de cabra

La leche humana es considerada como el mejor alimento natural para infantes por sus propiedades nutricionales, inmunológicas y desde el punto de vista de seguridad alimentaria. La leche de cabra ha sido recomendada como un sustituto a la leche de vaca y la leche humana (Zenebe et al., 2014). El principal aspecto de demanda para la leche de cabra deriva del problema de las alergias en la leche de vaca y otros problemas gastrointestinales (Gobba et al., 2014; Forminga de Sousa et al., 2015).

La leche de cabra puede ser considerada para reemplazar a los productos de leche y mejorar la salud humana especialmente para la gente que sufre alergia a las proteínas de la leche de vaca, debido a la composición de sus proteínas, especialmente la baja cantidad de proteínas alergénicas como  $\alpha$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina (Muñoz-Salinas et al., 2022). Esta leche es de un interés particular debido a su composición específica y su alta calidad para alimento de infantes y en población con necesidades particulares (Park, 2006; Yangilar, 2013; Zenebe et al., 2014; Nunez-Sánchez et al., 2016). La leche de cabra provee nutrición al cuerpo humano y tiene poder antioxidante, antimicrobiano, antialérgico (Kumar et al., 2016).

Una de las características más importantes en la leche de cabra, es la naturaleza de su grasa, su valor nutricional y sus características sensoriales la cual es rica en triglicéridos de cadena media (TCM), que son compuestos de ácidos grasos que están constituidos de 6 a 12 átomos de carbono (Amigo y Fonseca, 2011). Esta es la razón por la que se denomina así a los ácidos grasos conocidos como caproico (C6), caprílico (C8) y

cáprico (C10). Estos tres ácidos grasos componen de 15 a 18% de todos los ácidos presentes en la leche de cabra, pero sólo del 5 al 9% en la leche de vaca (Clark y García, 2017). Presenta una alta cantidad de ácido butírico, láurico, mirístico, palmítico y ácido linolénico omega-3, además de bajo contenido en ácidos grasos de cadena larga tales como ácido esteárico y oleico con respecto a la leche de vaca (Núñez-Sánchez et al., 2016).

Los lípidos en la leche de cabra se encuentran de manera abundante en forma de glóbulos con un tamaño de menos de 3  $\mu\text{m}$ , lo cual permite una mayor digestibilidad y una mayor eficiencia en el metabolismo lipídico comparado con la leche de vaca (Haenlein, 2004). La leche de cabra no contiene aglutinina, proteína responsable de la agregación de glóbulos de grasa en leche de vaca, razón por la cual los glóbulos permanecen dispersos y pueden ser atacados más fácilmente por las enzimas digestivas (Amigo y Fonseca, 2011).

Un aspecto importante de la leche de cabra es el contenido de ácido linoleico conjugado (CLA), ácido graso de 18 carbonos con reconocida actividad contribuyendo a la inhibición de cáncer, aterosclerosis y mejoramiento de las funciones inmunes (Elwood et al., 2010). El porcentaje de ácidos grasos saturados en la leche de vaca y cabra son alrededor de 70% (Barlowska et al., 2011), los ácidos grasos poliinsaturados son 2.9% en leche de vaca y 4.7% en leche de cabra, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados están alrededor de 27.7% en leche de vaca y 24.5% en leche de cabra (Saroha et al., 2014; Qureshi et al., 2012).

### II.3.2 Beneficios nutricionales de la leche de cabra

Estudios han reportado compuestos bioactivos de la leche de cabra con características bioquímicas, fisiológicos y nutricionales que tienen un gran potencial en la salud humana, como las que se mencionan a continuación:

- Desarrollo gastrointestinal tanto en función como en actividad
- Desarrollo infantil
- Desarrollo inmunológico y funcional
- Actividad microbiológica, como antibiótico y acción probiótica.

(Gobbetti et al., 2007).

Además, la leche de cabra presenta alta digestibilidad, alcalinidad distintiva, alto contenido de ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena media, zinc, hierro, magnesio y calcio, fuerte actividad antimicrobiana por la presencia de lactoperoxidasa, características inmunológicas y antibacteriales y altos niveles de aminoácidos como valina, glicina e histidina. Por ello la leche de cabra se ha recomendado con fines nutricionales, y como un alimento con funciones terapéuticas para pacientes que sufren varias alergias y para quienes necesitan una mejor absorción de nutrientes, además de su alta capacidad de amortiguador que es utilizada para tratamiento de ulcera péptica (Park, 1994; Slacanac et al., 2010).

Otra característica importante de la leche de cabra es el contenido de ácido siálico, el cual se encuentra en concentraciones de hasta 8 mg/dL mientras que en la leche humana se encuentra en una concentración de aproximadamente 30 mg/dL. El ácido siálico se encuentra en alta concentración en los gangliósidos del cerebro, los cuales tienen una estructura importante y elementos funcionales para el cerebro. Los infantes pueden no tener suficiente y eficiente síntesis de ácido siálico por lo inmaduro de su hígado por lo que se tiene que recurrir a la suplementación del ácido siálico en la dieta. Dichas alternativas pueden ser la leche materna o de alguna otra forma de alimentación, incluida la leche de cabra (Wang et al., 2001).

### II.3.3 Bioactivos en leche

El nivel de componentes bioactivos en productos de leche depende primeramente en su contenido en leche cruda y en las condiciones de procesamiento. La leche cruda

contiene ingredientes bioactivos naturales que pueden ser incrementados como un resultado de genética y procesos de crianza, así como de la dieta animal. Algunos de los componentes de la leche más susceptibles al cambio son los ácidos grasos presentes en la grasa de la leche, vitaminas liposolubles y carotenoides. (Aro et al., 2000; Evans et al., 2002; Józwik et al., 2010; Szumacher-Strabel et al., 2011; Frelich et al., 2012).

Componentes apropiadamente seleccionados en la alimentación en rumiantes pueden constituir una fuente de sustratos para microorganismos colonizando el rumen y como resultado de procesos de fermentación de nutrientes produce compuestos biológicamente activos. Un ejemplo de compuestos que tienen una alta actividad biológica en la leche de rumiantes es el ácido linoleico que puede prevenir el desarrollo de muchas enfermedades relacionadas con la civilización. (Park, 2009; Van Arendonk, 2011).

Algunos compuestos encontrados en alimentos pueden disminuir cambios en DNA que dirigen a la reducción de lípidos y proteínas causada principalmente por la presencia de radicales libres. Investigaciones recientes han demostrado que ácidos grasos, ácido hidroxinámico y flavonoides juegan un rol sinérgico antioxidante que protegen a las células por diferentes mecanismos, contra el peligro de los radicales libres (Halliwell, 1996). Se ha encontrado relación entre el consumo de forraje y compuestos antioxidantes en leche de cabra, particularmente en flavonoides como rutina y quercetina (De Feo et al., 2006). Middleton et al., 2000 reportó que la quercetina es el mejor antioxidante de los flavonoides, cinco veces más potente que vitaminas A y C.

#### II.4 Alimentación de cabras

Los bovinos, ovinos y caprinos tienen la habilidad de convertir carbohidratos y proteínas presentes en los vegetales en nutrientes disponibles para el ser humano. Una alimentación del ganado en praderas ofrece a los humanos una fuente nutritiva de

carne y leche teniendo grandes beneficios en la salud humana por la presencia de compuestos nutraceuticos que ayudan a disminuir las enfermedades metabólicas y crónicas degenerativas como la diabetes e hipertensión (Rinehart, 2008).

Las cabras se adaptan bien a las condiciones ambientales en tierras áridas, obteniendo una dieta adecuada incluso cuando el forraje es escaso ya que pueden alimentarse en terrenos rocosos inaccesibles. El pastizal mexicano está dominado por diferentes especies vegetativas las cuales usualmente contienen ciertos metabolitos benéficos para la salud humana incluyendo alcaloides, glucósidos, ácidos grasos, terpenos, fenoles, saponinas, taninos y flavonoides (Cuchillo et al., 2009a; Ruiz-Terán et al., 2008; Galina et al., 2007).

#### II.5 Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

El género *Medicago* pertenece a la subfamilia de leguminosas y comprende 87 especies de plantas con flor incluyendo cultivos de *M. sativa* L. (alfalfa o lucerne) (Steele et al., 2010; Small, 2011; Sanders et al., 2011). La alfalfa es el cuarto cultivo con mayor valor económico en el Norte de América después del maíz, soya y trigo y es el más importante cultivo de forraje en el mundo (Mielmann, 2013).

Las leguminosas (Fabáceas) constituyen una amplia diversidad de familia de plantas que incluyen cultivos económicamente importantes. Las leguminosas son plantas cultivadas que tienen habilidad para establecer interacciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno. Las especies de leguminosas son fuentes ricas de fitoquímicos para la salud (Terpolilli et al., 2012).

El factor ambiental que más limita la productividad y estabilidad de plantas es el estrés por déficit hídrico (Araus et al., 2002). La fotosíntesis y el crecimiento celular son los primeros procesos afectados por la sequía (Chaves y Oliveira, 2004; Chaves et al., 2009). Aunque es generalmente aceptado que el cierre estomatal es el principal factor

limitado por la actividad fotosintética bajo condiciones moderadas o limitadas de agua (Chaves et al., 2003), cuando el estrés al agua es más severo, tiene lugar un déficit metabólico (Medrano et al., 2002). Efectos dañinos de sequía en fotosíntesis serían mediados por la capacidad de respuesta de: i) el sistema respiratorio, transporte de electrones y la síntesis de ATP en la mitocondria (Atkin and Macherel, 2009), ii) la acumulación de metabolitos por estrés (Zhang et al., 2000) and iii) expresión de genes y síntesis de proteínas (Lawlor y Tezara, 2009).

### II.5.1 Periodo de cosecha

El valor nutritivo del heno de alfalfa es influenciado por muchos factores como el periodo de cosecha. Cortando la alfalfa en un estado de crecimiento óptimo puede mejorar los campos y la calidad del cultivo (Yari et al., 2012). El cultivo de alfalfa en un estado de brote tiene mayor cantidad de hojas que en el tallo, pero en la floración temprana, las hojas y los tallos son muy cercanos. En un estado de floración tardía, la fracción del tallo en el forraje es más grande que la de las hojas (Sheaffer et al., 2000). Muchos investigadores también han reportado la disminución de proteína cruda (PC) y un incremento en el contenido de fibra en estados de madurez avanzada (Lamb et al., 2003).

La cosecha en un estado de temprana floración ocasiona campos de cultivo con altas concentraciones de nutrientes en el forraje. Sin embargo, es difícil de alcanzar en lugares con climas semiáridos. Muchos metabolitos y nutrientes especialmente proteínas, pueden disminuir durante este tiempo ocasionando una reducción en el valor relativo para la alimentación (RFV); parámetro ampliamente aceptado en la calidad del forraje para el desarrollo del animal (Kiraz, 2011).

Algunos reportan que las proteínas de la alfalfa son localizadas principalmente en los cloroplastos, y la transición de crecimiento vegetativo a crecimiento reproductivo incrementa la producción de nutrientes y la lignificación, dirigiendo a la disminución del

contenido de proteína cruda (Lamb et al., 2012). El contenido de proteína cruda de alfalfa esta entre 15 y 22% y se distribuye principalmente en las hojas. La proteína cruda es dividida en dos categorías: proteína verdadera y nitrógeno no proteico (NPN) que es utilizado por las bacterias del rumen para convertirlo en proteína. El nitrógeno no proteico incluye aminoácidos libres, aminos, purinas, pirimidinas y alcaloides siendo estos 1/3 del contenido total de nitrógeno en la alfalfa. El L-ácido glutámico y glutamina juegan un rol vital en el metabolismo de nitrógeno, son precursores de varios aminoácidos, de purinas y pirimidinas. El contenido de L-ácido glutámico y glutamina en alfalfa a mitad de floración es significativamente más bajo que en periodo de brote (Bezerra et al., 2016).

#### II.5.2 Metabolitos secundarios

Entre los metabolitos secundarios producidos por especies de *Medicago* están las saponinas y isoflavonas, las cuales son de más alto interés y más exploradas. La lignina son otros compuestos fenólicos que son encontradas en alto porcentaje en las plantas y son un factor importante que afecta la digestibilidad de la pared celular del forraje incluyendo la alfalfa (Dixon y Sumner, 2003).

Las partes verdes de plantas son el principal blanco para herbívoros pero se debe tener en cuenta que las saponinas presentes en las partes aéreas de *Medicago* pueden contribuir a disminuir el ataque de herbívoros (Tava y Avato, 2006). La acumulación de saponinas en la planta lo vuelve no palatable para herbívoros, debido a su sabor amargo. La administración intraruminal de saponinas de alfalfa parcialmente hidrolizadas conducen a reducir la fermentación microbiana y la degradación de nutrientes en el rumen de ovejas, el conteo total de protozoarios en el rumen se reduce por las saponinas de alfalfa, debido a la disrupción de las membranas celulares de protozoarios por la formación de productos insolubles en agua de ácido medicagénico con esteroides de membrana. En adición, las saponinas de la alfalfa inhiben la motilidad ruminal en ovejas y ganado, por lo que parecen ser las responsables de algunos casos

de inflamación en el rumen. Las saponinas también exhiben efectos tóxicos en animales monogástricos e insectos herbívoros (Golawska, 2007).

Por su parte los flavonoides juegan roles bioquímicos y fisiológicos en la planta y son involucrados en interacciones de la planta con su ambiente, por simbiosis benéfica y por respuesta a estrés biótico (ataque que patógenos y herbívoros) y abiótico (luz UV, salinidad, deficiencia de nutrientes) (Weston y Mathesius, 2013). En *Medicago* se acumulan isoflavonoides en respuesta a elicitación por hongos (Zhou et al., 2011).

La lignina es un complejo biopolímero que se encuentra en la pared celular y juega un rol en el soporte mecánico de la planta. Está firmemente tejido con polímeros de celulosa y hemicelulosa previendo fuerza a la pared celular. La reducción del contenido de lignina puede mejorar la digestibilidad del forraje. Estudios en *Arabidopsis thaliana* han mostrado que reduciendo los niveles de lignina dirige a incrementar los niveles de estrés por la hormona ácido salicílico (SA) ocasionando un crecimiento reducido en la planta (Gallego-Giraldo, et al., 2011).

## II.6 Estrés abiótico con peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es la molécula más estable de las especies reactivas de oxígeno (ERO) ya que tiene una pobre reactividad con moléculas orgánicas y fácilmente se puede difundir a través de las membranas de las células. Además, el peróxido de hidrógeno juega un rol en la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico. Se ha reportado que peróxido de hidrógeno induce tolerancia a estrés en plantas debido a la activación de genes que codifican enzima o proteínas involucradas en la defensa al estrés (Kuzniak y Urbanek, 2000). Recientes investigaciones han mostrado que el peróxido de hidrógeno puede actuar como una molécula de señalización en plantas estimulando funciones fisiológicas y reacciones bioquímicas a concentraciones de nanomoles, regulando el crecimiento y desarrollo de las plantas (Nazir et al., 2019a, b; 2020).

Las concentraciones nanomolares ( $10^{-9}$ ) de peróxido de hidrógeno tienen una función como señalizadores o segundos mensajeros que estimulan el crecimiento celular y la proliferación, mientras concentraciones micromolares ( $10^{-6}$ ) promueven el detenimiento del ciclo celular e inducen los procesos adaptativos modificando la expresión de diferentes genes y cuando las concentraciones son milimolares ( $10^{-3}$ ), el peróxido de hidrógeno induce un estado de estrés oxidativo que la célula no puede contrarrestar, generando la muerte celular por procesos apoptóticos o necróticos (Pickering et al., 2012).

Se ha reportado que el peróxido de hidrógeno actúa como elicitador contrarrestando el estrés causado por factores ambientales, tales como el estrés al cobre en *Solanum lycopersicum* (Nazir et al., 2019a, 2019b; Hasanuzzaman et al., 2017), estrés por sequía en *Triticum aestivum* (Andrade et al., 2018) y *Brassica juncea* (Hossain y Fujita, 2013), estrés por salinidad en *Triticum aestivum* (Bagheri et al., 2019; Ashfaque et al., 2014), estrés por calor en *Zea mays* (Hosseini y Wahid, 2016) y *Solanum lycopersicum* (Nazir et al., 2019b) y estrés por bajas temperaturas (Khan et al., 2019). Además, existen reportes que demuestran que el peróxido de hidrógeno está involucrado en la transducción de las señales río abajo que inducen la expresión de genes que mejoran la adaptabilidad de las plantas bajo condiciones de estrés (Khan et al., 2018). Según Khedia et al. (2019), el rol del peróxido de hidrógeno en la síntesis de proteínas regula numerosos procesos tales como el ajuste osmótico y la protección de proteínas bajo condiciones de estrés en plantas.

### III. HIPÓTESIS

Con forraje elicidado en la alimentación de cabras estabuladas se incrementará el contenido de bioactivos en la leche que son benéficos para el ser humano de manera significativa en relación al manejo convencional, debido al cambio cuantitativo y cualitativo en la biosíntesis de metabolitos secundarios como producto de la elicitación.

### IV. OBJETIVOS

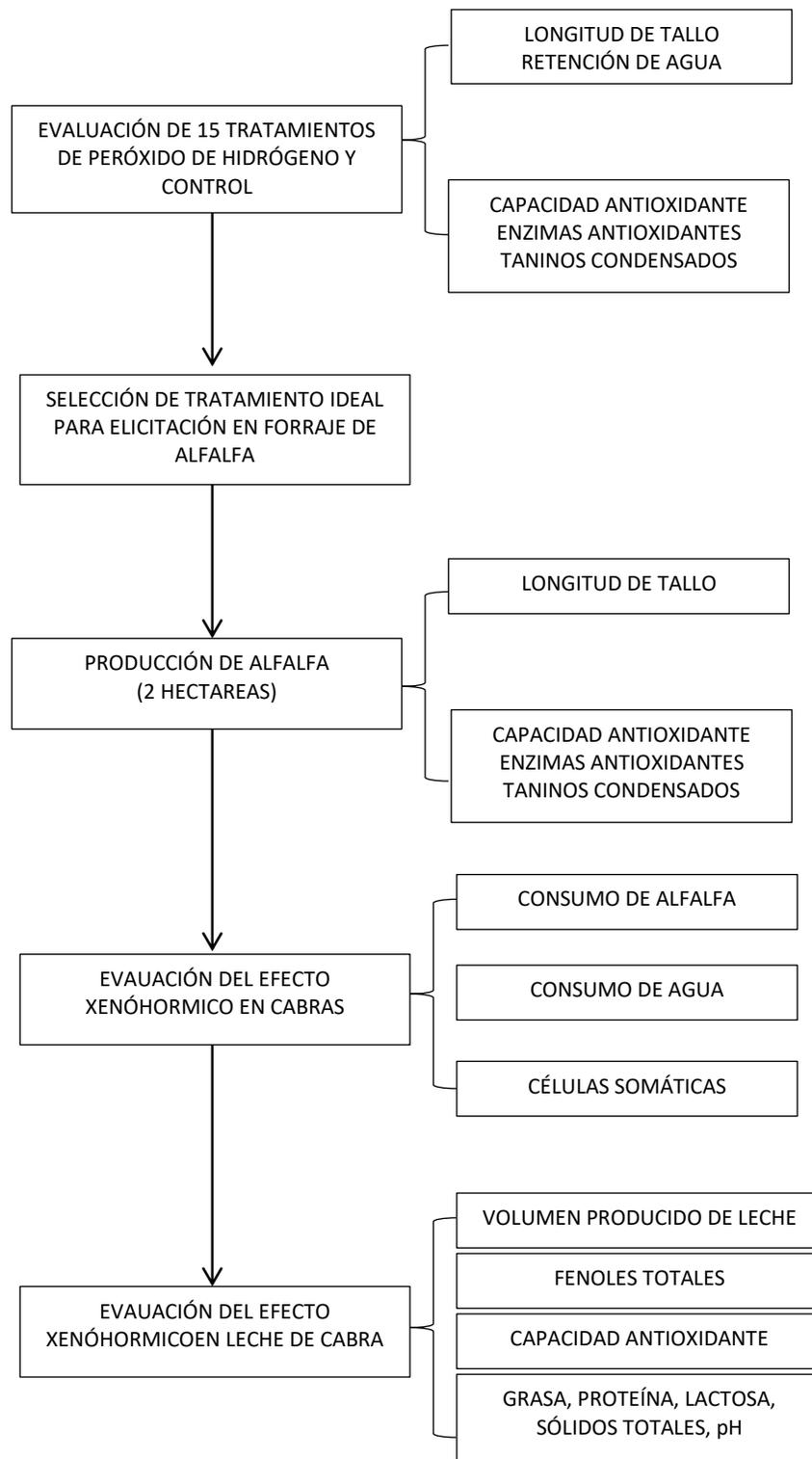
#### General

Determinar la dieta de cabras mediante forraje elicidado para incrementar el contenido de bioactivos en su leche, potenciando así los efectos benéficos para el ser humano.

#### Específicos

- Determinar el impacto metabolómico inducido por la elicitación en la alfalfa.
- Evaluar el posible efecto xenohórmico en las cabras alimentadas con forraje elicidado.
- Determinar el potencial xenohórmico de la leche de las cabras en tratamiento.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS



## **V.1 Determinación del impacto inducido por la elicitación en la alfalfa.**

### **V.1.1. Evaluación de diferentes tratamientos de peróxido de hidrógeno (Fase 1)**

Se evaluaron 15 tratamientos de peróxido de hidrógeno y un control que se mencionan en el Cuadro 2 (Muñoz et al., 2021). El tratamiento control consistió en la aplicación de agua. Las soluciones tratamiento fueron preparados en mismo día de aplicación y debidamente protegidos de la luz. Las aplicaciones se realizaron semanalmente y manejando un periodo de cultivo de alfalfa de aproximadamente 35 días.

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de peróxido de hidrógeno</b>
1	Control
2	98 mM con 3 aplicaciones
3	98 mM con 2 aplicaciones
4	98 mM con 1 aplicación
5	294 mM con 3 aplicaciones
6	294 mM con 2 aplicaciones
7	294 mM con 1 aplicación
8	490 mM con 3 aplicaciones
9	490 mM con 2 aplicaciones
10	490 mM con 1 aplicación
11	784 mM con 3 aplicaciones
12	784 mM con 2 aplicaciones
13	784 mM con 1 aplicación
14	980 mM con 3 aplicaciones
15	980 mM con 2 aplicaciones
16	980 mM con 1 aplicaciones

Cuadro 2. Tratamientos para elicitación de alfalfa

Así, se probaron 16 tratamientos (Cuadro 2), en cuatro repeticiones con unidades experimentales de 9 m<sup>2</sup> (Figura 1). Los tratamientos fueron distribuidos de manera aleatoria en el área experimental con un Diseño de Bloques al azar.

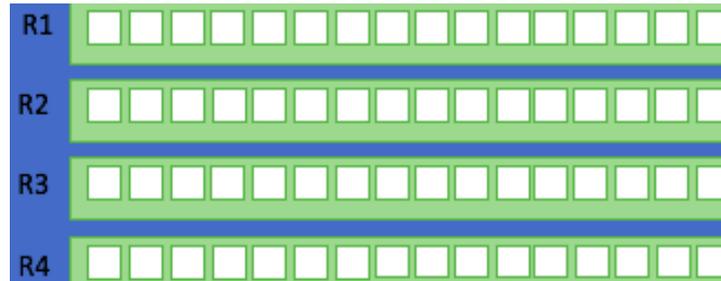


Figura 1. Esquema que ilustra el área experimental para el cultivo de alfalfa.

### ***V.1.2. Medición de las variables longitud de tallo y cantidad de agua***

Longitud de tallo: Fue evaluada mediante una escala graduada con una medición de los tallos de alfalfa. Los tallos a medir fueron seleccionados aleatoriamente. El número de muestras fue de 80 datos por cada tratamiento.

Cantidad de agua: Se realizó por medio de la cuantificación de peso fresco y peso seco de una cantidad de muestra de alfalfa correspondiente a un área de 575 cm<sup>2</sup> por cada tratamiento. En un papel se colocó una cantidad conocida de muestra y se dejó exponiéndose la muestra en el sol hasta que tuviera un peso constante, en ese punto el agua de la muestra ya se había evaporado y sólo quedó la cantidad de biomasa sin agua en cada muestra. Se sacó la relación de porcentaje de biomasa con las dos mediciones. El número de muestras fue de 12 por cada tratamiento.

### ***V1.3. Evaluación del perfil metabólico en el forraje***

Actividad antioxidante (ABTS). Este ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Nenadis *et al.*, (2004). Para la curva estándar se utilizó una solución de Trolox a una concentración de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 µM. Para generar el radical ABTS●+ se preparó una solución stock de ABTS 7 mM, se tomaron 5

mL de la solución acuosa, se le adicionaron 88  $\mu\text{L}$  de persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 140 mM y se almacenó en oscuridad por 12 h. Después la solución que contiene el radical se midió a una longitud de onda  $\lambda = 734 \text{ nm}$  y se diluyó en etanol (de 20 a 25 ml) hasta que el valor de la absorbancia alcanzara un valor menor a 1.0. Posteriormente se prepararon las muestras en una placa de 96 pozos, al blanco se le adicionaron a 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y 230  $\mu\text{L}$  de etanol, para los controles se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de metanol y agua destilada, finalmente se les adicionaron 230  $\mu\text{L}$  de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . La medición de la absorbancia se llevó a cabo a los 730 nm por un lapso de 0-6 min.

Actividad antioxidante (DPPH). El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos, primero se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de los extractos y posteriormente se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{DPPH}^{\bullet}$  al 80% en metanol, para el control positivo se utilizó Trolox y para el negativo todos los reactivos a excepción de los extractos (Fukumoto y Mazza, 2000). Se midió la absorbancia de 520 nm a diferentes tiempos (0, 4, 10, 30, 60, 90 y 120 min). Los resultados se reportaron como % ARA (Capacidad antiradical).

Enzimas antioxidantes. El contenido de proteína para todas las enzimas fue medido de acuerdo al método de Bradford (1976) por medio de un extracto enzimático.

Catalasa (CAT). La actividad de catalasa fue monitoreada espectroscópicamente de acuerdo a Aebi (1984) para la medición de la tasa de disminución de peróxido de hidrógeno a 240 nm a temperatura ambiente. El cambio de absorbancia a 240 nm fue medido por 6 minutos usando la tasa de descomposición de peróxido de hidrógeno por catalasa ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  consumido por minuto). Cada tratamiento fue repetido 3 veces.

Superóxido dismutasa (SOD). El total de actividad SOD fue estimada por la inhibición de la reducción fotoquímica de nitroazul de tetrazolio (NBT). La reacción contiene 1.5 mL de bufer de fosfato 0.05 M (pH 7.8), 0.3 mL de  $\text{EDTA-Na}_2$  0.1  $\text{mmol L}^{-1}$ , 0.3 mL de metionina 0.13  $\text{mol L}^{-1}$ , 0.3 mL de NBT 0.75  $\text{mmol L}^{-1}$ , 0.3 mL de riboflavina 0.02  $\text{mmol L}^{-1}$ , 0.05 mL de extracto y 0.25 mL de agua destilada. El volumen total de reacción fue

de 3 mL. Después de exponer a luz blanca por 30 minutos se mide la absorbancia de la muestra a 560 nm. La actividad de SOD fue determinada como 50% de inhibición de la reducción de NBT causada por el superóxido generado por la reacción de foto reducción de riboflavina y oxígeno. El total de actividad SOD fue expresado en unidades por miligramo de proteína (Gao, 2006).

Fenilalanina amonoliasa (PAL). La actividad de PAL fue determinada de acuerdo al método Mozzetti et al., 1995. Para la determinación se utilizó 200 µL de extracto a los cuales se le adicionaron 2.3 mL de buffer de reacción (borato 0.1 M, 10 mM fenilalanina, pH 8.8). La reacción fue incubada a 40°C por 1 hora. Después de transcurrido el tiempo se le adicionaron 0.5 mL de HCl 5 N. La absorbancia fue determinada a 290 nm. La actividad de PAL fue calculada como los mmol de ácido cinámico por gramo de muestra, producido bajo condiciones específicas y expresadas como unidades por mg de proteína (Mozzetti et al., 1995).

Taninos condensados. La cuantificación se realizó de acuerdo al método de la vainillina descrito por Deshpande y Cheyran, 1987. Se pesaron 0.008 g de catequina en 10 mL de metanol como solución stock. La curva tuvo los siguientes puntos (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/mL). En una placa se colocaron 50 µL de cada disolución por triplicado. Se adicionaron 200 µL de solución 1:1 HCl 8% vainillina 1%, los cuales se fueron adicionados de 50 en 50 hasta llegar a 200 µL. El blanco consistió en 50 µL de metanol más 200 µL de HCl al 4%. Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 492 nm. La cantidad de taninos condensados fue expresada en mg de taninos por g de muestra.

#### ***V.1.4. Evaluación de forraje elicitado con peróxido de hidrógeno (Fase 2)***

Se cultivó una hectárea de alfalfa (*Medicago sativa*) para la alimentación de las cabras. La parcela fue dividida de la siguiente manera: media hectárea fue elicitada mediante la aspersión de una solución de peróxido de hidrógeno (294 mM) mediante tres aplicaciones (una cada semana). La media hectárea restante no recibió tratamiento. Al

total de la parcela experimental se le realizaron determinaciones fisiológicas y bioquímicas.

#### ***V.1.5. Diseño experimental para evaluación de forraje elicitado***

Se utilizaron 21 cabras productoras de leche de la raza *Alpino Francés*, divididas en tres grupos estabulados y con diferente dieta (tratamiento) cada uno, un tratamiento estuvo complementado con forraje elicitado. El desarrollo del proyecto en cuanto a manejo animal se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Naturales, Campus Amazcala UAQ municipio de Querétaro. El consumo de alimento y agua fue administrado *ad libitum*.

Para la realización del proyecto se siguió el Manual de Buenas Prácticas en Producción de Leche Caprina (SAGARPA-SENASICA). El monitoreo del estado de salud de las cabras se llevó a cabo por medio de especialistas y estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Se trabajó con un diseño de bloques al azar con los siguientes tratamientos para los animales en experimentación. La unidad experimental fue de 7 cabras en cada tratamiento, donde la dieta fue el factor de variación. El experimento fue repetido 3 veces con la finalidad de disminuir el error experimental. Cada experimento duró 7 días, con un periodo de lavado de 15 días al inicio de la experimentación. El periodo de lavado es el período de adaptación de los animales a las condiciones experimentales.

1. Cabras alimentadas de forma convencional
2. Cabras alimentadas con forraje no elicitado
3. Cabras alimentadas con forraje elicitado

## ***V.2. Evaluación del efecto xenohórmico en las cabras***

Se evaluaron las siguientes variables fisiológicas:

Consumo de alfalfa: Se realizó durante la experimentación mediante el pesaje de la ración proporcionada a cada animal durante los 15 días de experimentación. Se pesó la alfalfa que no consumió el animal y se determinó la cantidad de forraje ingerido.

Células somáticas. Se evaluó mediante el equipo Ekomilk Scan al inicio y al final del experimento. La medición fue realizada para evaluar el estado de salud de la ubre, el bienestar de los animales y por ende la calidad de la leche.

Consumo de agua. La evaluación consistió en la medición del agua consumida diariamente por cada animal durante los 15 días de experimentación. Esto se llevó a cabo mediante cubetas graduadas para conocer el agua servida y determinar la cantidad de agua consumida por cada animal. La cantidad consumida se determinó por diferencia de volumen al inicio y final. La medición fue realizada en un horario establecido.

## ***V.3. Evaluación del potencial xenohórmico en la leche de cabra***

Para la evaluación del potencial xenohórmico de la leche de cabra se evaluaron las siguientes variables:

Volumen producido de leche por animal. Fue evaluado mediante la medición del volumen en ordeñadora.

Proteína, grasa, lactosa, sólidos totales, pH. Se evaluaron por medio de equipo LactoScan MCC50, Número serial 8123. El equipo fue calibrado antes del análisis de las muestras para una mayor confiabilidad.

Actividad antioxidante (ABTS). Este ensayo se realizará de acuerdo a la metodología descrita por Nenadis *et al.*, (2004). Para la curva estándar se utiliza una solución de Trolox a una concentración de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800  $\mu\text{M}$ . Para

generar el radical ABTS●+ se preparará una solución stock de ABTS 7 mM, se toman 5 mL de la solución acuosa, se le adicionan 88 µL de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) 140 mM y se almacenó en oscuridad por 12 h. Después la solución que contiene el radical se mide a una longitud de onda  $\lambda = 734$  nm y se diluyó en etanol (de 20 a 25 ml) hasta que el valor de la absorbancia alcanza un valor menor a 1.0. Posteriormente se prepararán las muestras en una placa de 96 pozos, al blanco se le adiciona a 20 µL de la muestra y 230 µL de etanol, para los controles se adiciona 20 µL de metanol y agua destilada, finalmente se les adiciona 230 µL de ABTS●+. La medición de la absorbancia se llevó a cabo a los 730 nm por un lapso de 0-6 min.

Actividad antioxidante (DPPH). El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos, primero se adicionan 20 µL de los extractos y posteriormente se adicionan 200 µL de DPPH● al 80% en metanol, para el control positivo se utilizó Trolox y para el negativo todos los reactivos a excepción de los extractos (Fukumoto and Mazza, 2000). Se midió la absorbancia de 520 nm a diferentes tiempos (0, 4, 10, 30, 60, 90 y 120 min). Los resultados se reportaron como % ARA (Capacidad antiradical).

Fenoles totales. El contenido de fenoles totales fue determinado por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Taga et al., 1984. La concentración fue calculada usando ácido gálico como estándar (Sigma-Aldrich). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por kilogramo de extracto.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.1. Impacto inducido en variables de sobrevivencia por la elicitación en la alfalfa

Para evaluar el impacto en alfalfa generado por la elicitación con  $H_2O_2$  se midió la longitud de tallo como variable representativa de supervivencia. En la Figura 2 se observa el efecto de la dosis de  $H_2O_2$  y el tiempo de exposición en la longitud de tallo. Cada barra representa el promedio de 80 datos por cada tratamiento. Sobresalen los

tratamientos 98 mM (2A), 294 mM (3A), 294 mM (2A), 490 mM (2A), 784 mM (3A) debido a que tienen mayor longitud de tallo con diferencia estadística significativa respecto a los demás.

Otra de las variables evaluadas fue la cantidad de agua retenida en la planta de alfalfa, la cual se observa en la Figura 3. El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ve reflejado en los tratamientos 98 mM (2A), 294 mM (3A), 294 mM (2A) donde se tuvo la mayor cantidad de agua con diferencia estadística significativa respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos sobresalientes en cuanto a cantidad de agua en la planta de alfalfa coincidieron con los tratamientos de mayor longitud de tallo como respuesta a dosis de peróxido de hidrógeno.

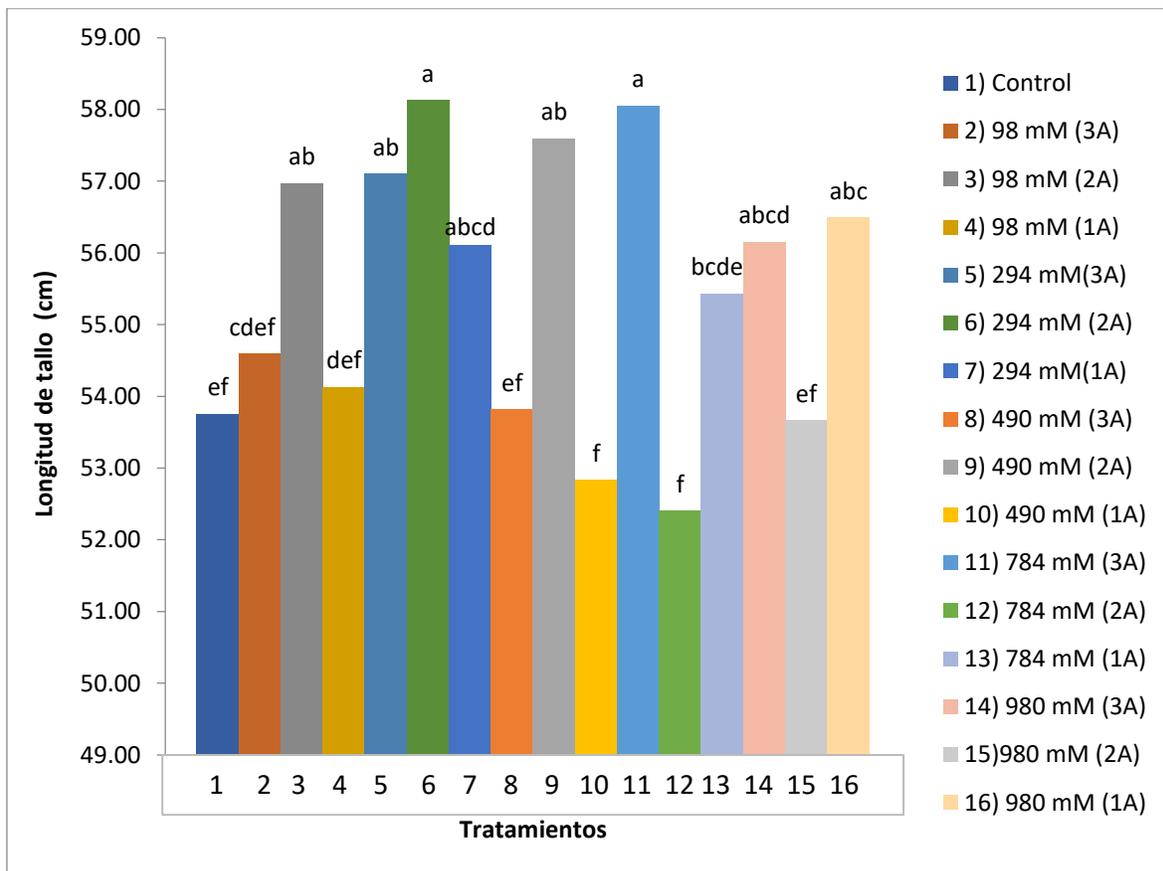


Figura 2. Longitud de tallo en alfalfa con diferentes concentraciones y número de aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A representa el número de aplicaciones H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a, b, c, d, e, f, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

Como se ha indicado, las variables fisiológicas son un indicador de la supervivencia de la planta. La alfalfa es un forraje con alta demanda hídrica para un desarrollo y supervivencia óptimo (aproximadamente 10 cm), dependiendo del suelo y la temporada de cultivo (INIFAP, 2014). En la Figura 3 se observa la cantidad de agua en la planta de alfalfa por cada tratamiento, representando el promedio de 12 datos por cada tratamiento. Las plantas que presentaron mayor cantidad de agua retenida son el 294 mM (3A), 98 mM (2A), 294 mM (2A) de peróxido de hidrógeno, tienen una similitud a los tratamientos que presentaron mayor longitud de tallo, por lo tanto las plantas tratadas con peróxido de hidrógeno a las concentraciones antes mencionadas tiene un mayor crecimiento respecto a los demás debido a que tienen una cantidad de agua mayor que les permite desarrollarse adecuadamente.

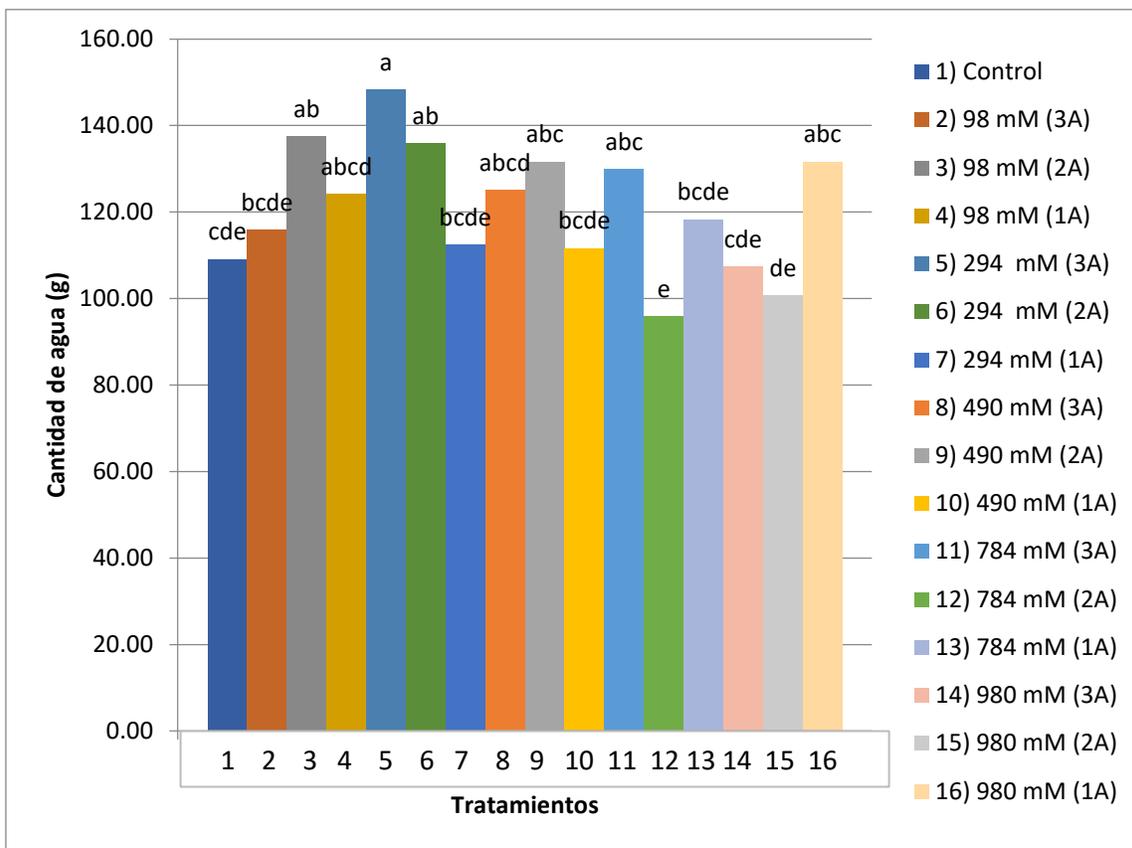


Figura 3. Cantidad de agua en planta de alfalfa con diferentes concentraciones y número de aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A representa el número de aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (a, b, c, d, e, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

## VI.2. Variables metabólicas

### VI.2.1. Capacidad Antioxidante ABTS y DPPH

Dentro de las variables metabólicas se evaluó la capacidad antioxidante ABTS y DPPH; los resultados de capacidad antioxidante, así determinada, se muestran en la Figura 4 y 5. En cuanto a ABTS los tratamientos que destacan son el 294 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1A (7), 98 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1A (4); los cuales fueron significativamente diferentes al control-agua (1) considerando una  $\alpha=0.05$ . Donde A es el número de aplicaciones de solución de peróxido de hidrógeno semanalmente. De nueva cuenta tiene una mayor actividad los tratamientos a dosis de 294 y 98 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se manifestó en variables

fisiológicas de longitud de tallo y cantidad de agua en la planta. Para la actividad antioxidante del radical DPPH el tratamiento 784 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (11) fue significativamente diferente al resto de los tratamientos.

Los resultados muestran una tendencia de una alta actividad antioxidante ABTS y DPPH en tratamientos con aplicaciones exógenas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El elicitor peróxido de hidrógeno a ciertas concentraciones tiene un rango de eustres o estrés benéfico para la planta de alfalfa según se observa en la Figura 4 y 5. La capacidad antioxidante que presentó la alfalfa puede tener correspondencia a los metabolitos secundarios que desarrolló la planta bajo el proceso de estrés generado por el peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de aplicación. La actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticáncer en la alfalfa es debida al contenido de flavonoides, saponinas, vitaminas, minerales, ácidos orgánicos y polisacáridos en la planta (Li et al., 2016), mejorando su función inmune (Gatouillat et al., 2014). Los flavonoides derivados de la alfalfa muestran una alta actividad antioxidante DPPH (Chen et al., 2016) que contribuyen al mantenimiento, producción, inmunidad y fermentación ruminal en el ganado bovino como lo reportó Zhan et al., 2017.

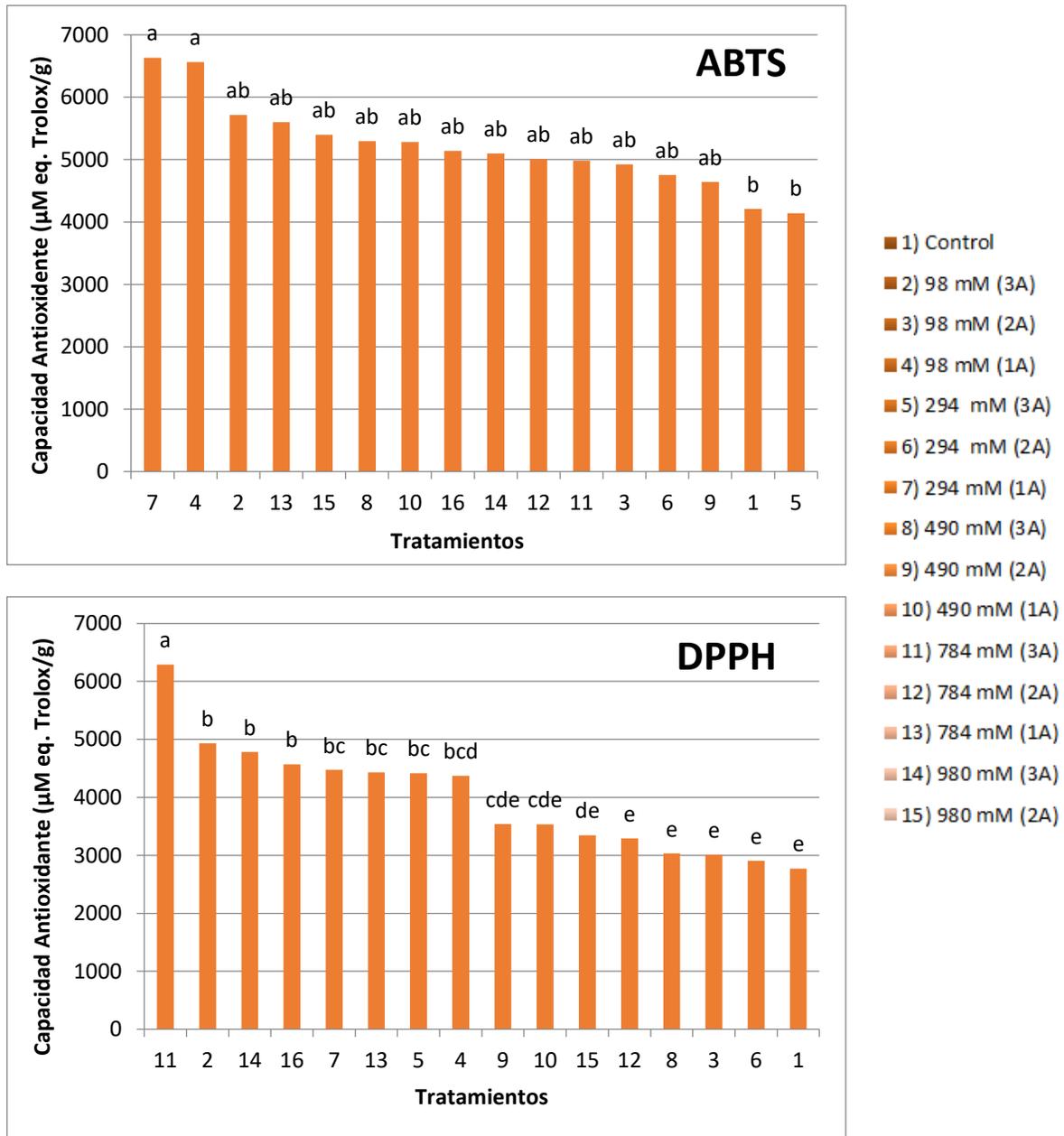


Figura 4, 5. Capacidad antioxidante ABTS y DPPH en alfalfa con diferentes concentraciones y número de aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (a, b, c, d, e, diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

## VI.2.2. Enzimas Antioxidantes

Para la actividad de la enzima Fenilalanina amonoliasa (PAL) los tratamientos con mayor actividad fueron el 784 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1A (13), 294 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1A (7), 294 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (5), 784 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (11) los cuales fueron estadísticamente diferentes considerando una  $\alpha=0.05$ . Donde A es el número de aplicaciones de solución de peróxido de hidrógeno semanalmente (Figura 6). PAL es una enzima relacionada con la síntesis de novo de metabolitos secundarios, por lo tanto pudiera ser que en estos cuatro tratamientos haya mayor cantidad de metabolitos secundarios con respecto al resto de los tratamientos, lo que concuerda con el análisis de capacidad antioxidante, donde los tratamientos con mayor actividad son 784 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (11) y 294 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-1A (7). PAL es la enzima responsable de la síntesis de metabolitos secundarios como fenoles totales y de capacidad antioxidante, como lo reportó Swieca, 2015, un aumento de fenoles y capacidad antioxidante en brotes de lenteja elicitados con peróxido de hidrógeno 15 y 150 mM. Muñoz-Salinas et al., 2021, también reportaron un incremento en la enzima PAL en plantas de alfalfa bajo un pretratamiento de la semilla con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 294 y 784 mM de peróxido de hidrógeno.

La catalasa (CAT) es una importante enzima que convierte el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> hasta llegar a un balance entre el sistema antioxidante y las especies reactivas de oxígeno (EROS). La Figura 7 muestra los tratamientos con mayor actividad: 784 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (11) y 294 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (5) con diferencia estadística significativa respecto a los demás tratamientos. Nazir et al., 2019b reportó que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previene el aumento del estrés oxidativo y un aumento en el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno, generando un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes SOD, POX, CAT.

Por otro lado, superóxido dismutasa (SOD) es la primera enzima en la línea de defensa que convierte el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que contrarresta la oxidación de los organismos. En el experimento tuvieron mayor actividad los tratamientos 294 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (5), 784 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-2A (12), 784 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (11) con diferencia estadística

significativa respecto al resto de los tratamientos. El peróxido de hidrógeno induce al sistema antioxidante, aumentando la actividad de las enzimas superóxido dismutasa restaurando el metabolismo celular, protegiendo el aparato fotosintético, además del metabolismo de la prolina y la reducción del estrés oxidativo (Wang et al., 2013; Khan et al., 2016; Nazir et al., 2019a). Los resultados obtenidos relacionados con la actividad enzimática sugieren que los tratamientos 294 mM y 784 mM de peróxido de hidrógeno son los que presentan la mayor actividad de las enzimas antioxidantes PAL, CAT y SOD.

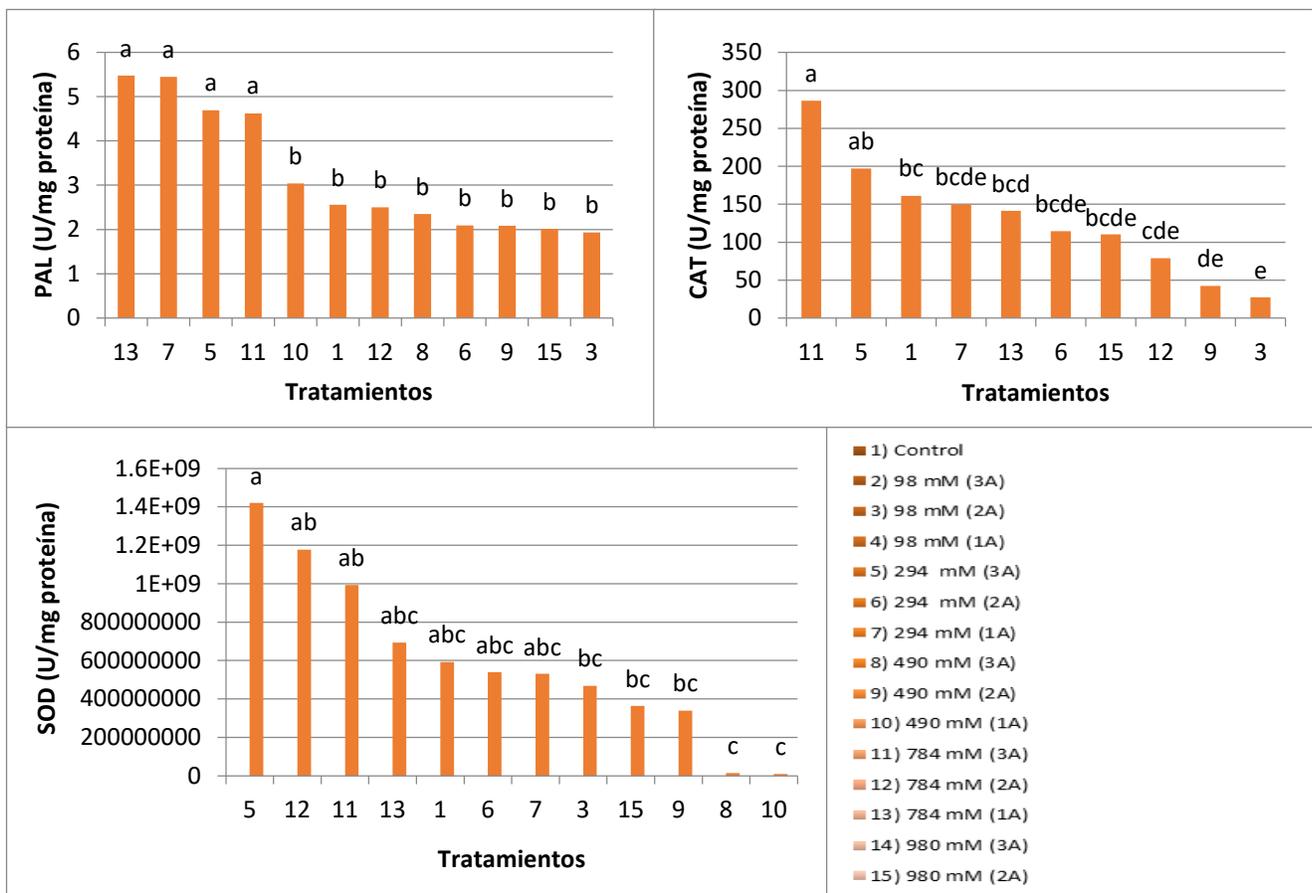


Figura 6, 7, 8. Enzimas antioxidantes Fenilalanina amonoliasa (PAL), Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD) en alfalfa con diferentes concentraciones y número de aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a, b, c, e diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

### VI.2.3. Taninos condensados

Los taninos condensados son un tipo de compuesto fenólico (flavonoides), que pueden ser oxidativamente degradados en ácido para producir antocianidinas, dependiendo la cantidad consumida pueden contribuir en la digestibilidad de las plantas provocando alteraciones o beneficios en el animal que las consuma debido al complejo formado entre el tanino condensado y las proteínas (Naumann et al., 2013). Dicha variable fue evaluada por su relación con problemas de timpanismo y digestibilidad en las cabras una vez que se evaluó el consumo de alfalfa. El tratamiento con mayor cantidad de taninos fue el control-agua (1) y el de menor cantidad fue 294 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3A (5). Lo antes mencionado sugiere que 294 mM (3A) produce menor cantidad de taninos que la alfalfa tratada con agua, por lo tanto el consumo de alfalfa elicitada con peróxido de hidrógeno a la concentración antes mencionada no ocasionaría problemas de digestibilidad del forraje.

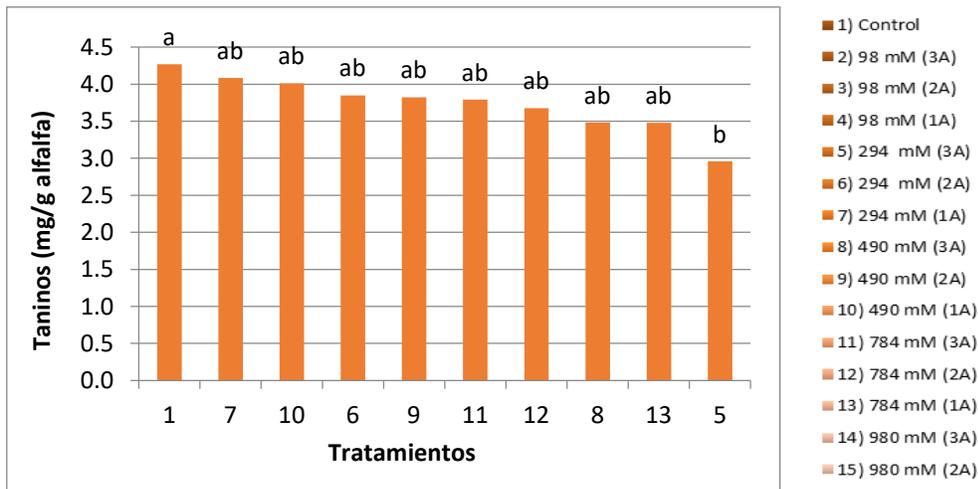


Figura 9. Taninos condensados en alfalfa con diferentes concentraciones y número de aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a, b, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

A partir del análisis de los 16 tratamientos de elicitación con peróxido de hidrógeno y considerando las variables evaluadas se concluyó que el tratamiento para elicitar la alfalfa en parcela (aproximadamente 1.0 ha) fue a una concentración de 294 mM con 3 aplicaciones, que corresponde al tratamiento 5.

## VI.2. Efecto xenohórmico en las cabras alimentadas con forraje elicitado

El impacto del forraje elicitado en la cabra fue evaluado mediante las variables de consumo alfalfa, consumo de agua, células somáticas y volumen de leche producido por cada animal.

### VI.2.1. Consumo de alfalfa

En la figura 10 se muestra el consumo de alfalfa de los animales alimentados con alfalfa elicitada con peróxido de hidrógeno, donde se observa que fue mayor el consumo de alfalfa de los animales que estuvieron alimentados con alfalfa tratada con peróxido de hidrógeno, cabe mencionar que el mayor consumo del forraje pudo ser por una mayor palatabilidad del forraje en el animal.

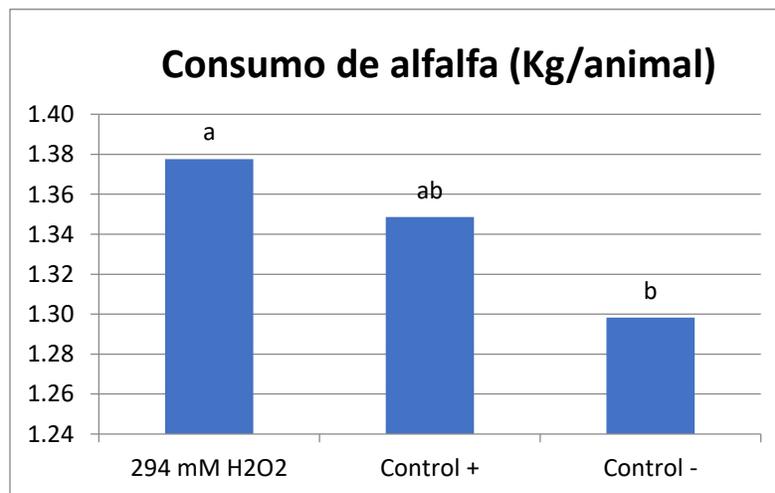


Figura 10. Consumo de alfalfa (Kg) de animales alimentados con alfalfa elicitada a 294 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 3 aplicaciones. Grupos control alimentados con alfalfa sin elicitación, Control +; alfalfa con proceso de producción similar a alfalfa elicitada pero sin aplicación

de  $H_2O_2$ . Control -; alfalfa producida en otra parcela diferente sin aplicación de  $H_2O_2$  (a, b, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

### VI.2.2. Consumo de agua

En la Figura 11 se muestra el consumo de agua de los animales alimentados con alfalfa elicitada con peróxido de hidrógeno, donde se observa que el consumo de agua fue similar al de los animales que estuvieron alimentados con alfalfa sin elicitación, esto es posible porque el consumo de agua en las cabras es parte de sus necesidades fisiológicas, según los resultados obtenidos el consumo de agua no estuvo relacionada con la elicitación aplicada al forraje, lo mencionado anteriormente es lo que se esperaba que el forraje no afectara en las funciones fisiológicas del animal.

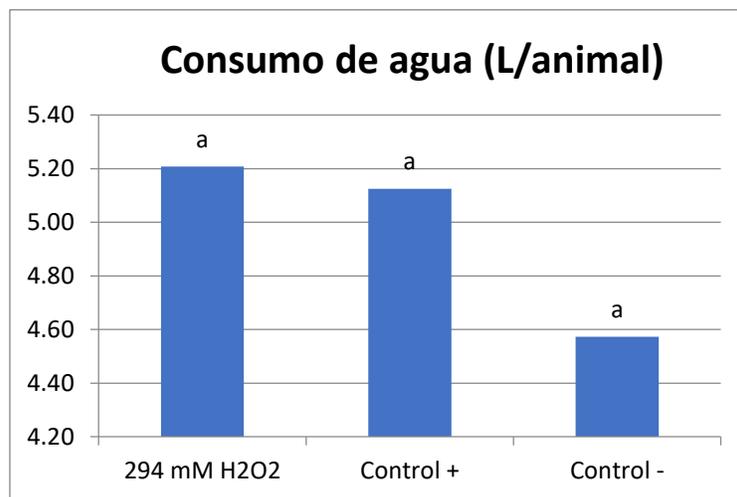


Figura 11: Consumo de agua (L) de animales alimentados con alfalfa elicitada a 294 mM de  $H_2O_2$  con 3 aplicaciones. Grupos control alimentados con alfalfa sin elicitación, Control +; alfalfa con proceso de producción similar a alfalfa elicitada pero sin aplicación de  $H_2O_2$ . Control -; alfalfa producida en otra parcela diferente sin aplicación de  $H_2O_2$  (a, representa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

### VI.2.3. Células somáticas

El análisis de células somáticas en los animales sirvió como punto de referencia para conocer el estado de salud de la glándula mamaria de los animales en experimentación.

En la Figura 12 se muestra la diferencia de células somáticas al inicio y final del experimento. En el gráfico se muestra que no hubo diferencia estadística significativa entre tratamientos evaluados. El estado de salud de la glándula mamaria refleja el estado de salud y la producción de leche del animal. El consumo de los diferentes forrajes no afectó el estado de salud de la ubre de los animales en experimentación.

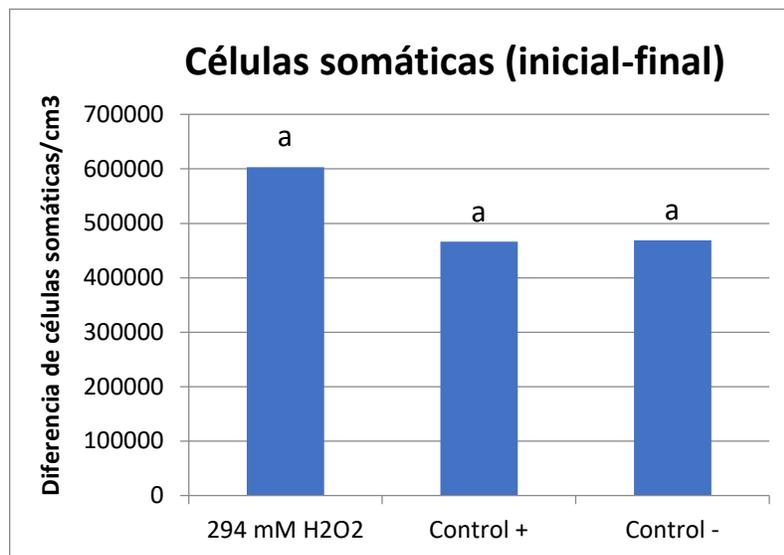


Figura 12: Diferencia de células somáticas de animales alimentados con alfalfa elicitada a 294 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 3 aplicaciones. Grupos control alimentados con alfalfa sin elicitación, Control +; alfalfa con proceso de producción similar a alfalfa elicitada, pero sin aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Control negativo; alfalfa producida en otra parcela diferente sin aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No se observa diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

#### VI.2.4. Volumen de leche producido

Las cabras tuvieron una producción de 1.9 a 2.0 L en promedio por animal sin importar el tratamiento recibido. Cabe hacer mención que los resultados mostrados en la Figura 13 observa que no existe diferencia estadística significativa en la producción de leche (L/animal) independientemente de la alimentación que haya recibido el animal. Por lo tanto, el impacto del consumo de alfalfa elicitada con 294 mM de peróxido de hidrógeno no se ve reflejado en el volumen de leche producido por el animal.

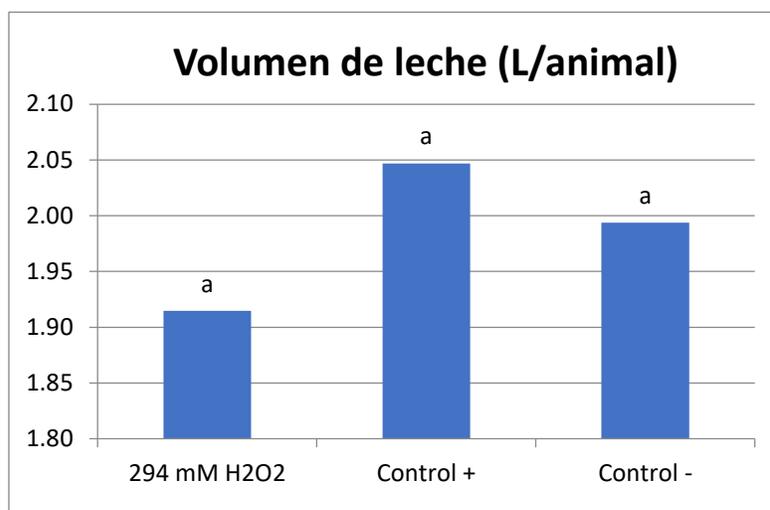


Figura 13. Volumen de leche (L) de animales alimentados con alfalfa elicitada a 294 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 3 aplicaciones. Grupos control alimentados con alfalfa sin elicitación, Control +; alfalfa con proceso de producción similar a alfalfa elicitada pero sin aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Control -; alfalfa producida en otra parcela diferente sin aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a, representa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

### VI.3. Potencial xenohórmico de la leche de cabras alimentadas con forraje elicitado

El potencial xenohórmico de la leche de cabra fue evaluado en cabras alimentadas con alfalfa elicitada a 294 mM de peróxido de hidrógeno en las variables bioquímicas de capacidad antioxidante (ABTS, DPPH), fenoles totales y taninos.

#### VI.3.1. Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales se realizó con la finalidad de evaluar el impacto que tuvo la alimentación de alfalfa en nutraceuticos en la leche. En la Figura 14 se muestra como los compuestos fenólicos totales de leche bajo el proceso de alimentación de la cabra con alfalfa elicitada fue significativamente superior al grupo control. Lo antes mencionado sugiere que la alfalfa elicitada tiene efecto en la calidad nutraceutica lo cual se ve reflejado en la leche, como un subproducto de la cabra.

Los fenoles encontrados en la leche de cabra de animales tratados pudieran relacionarse con la cantidad de fenoles totales encontrados en la planta de alfalfa elicitada a 294 mM con 3 aplicaciones como se muestra en la Figura 18 , donde la alfalfa elicitada contiene significativamente mayor cantidad de taninos condensados que el grupo control (ver anexo). Otro de los resultados relacionados es el contenido de flavonoides donde se encontró una mayor cantidad de estos en la alfalfa elicitada y fue superior a la alfalfa del grupo control (Figura 19, anexo).

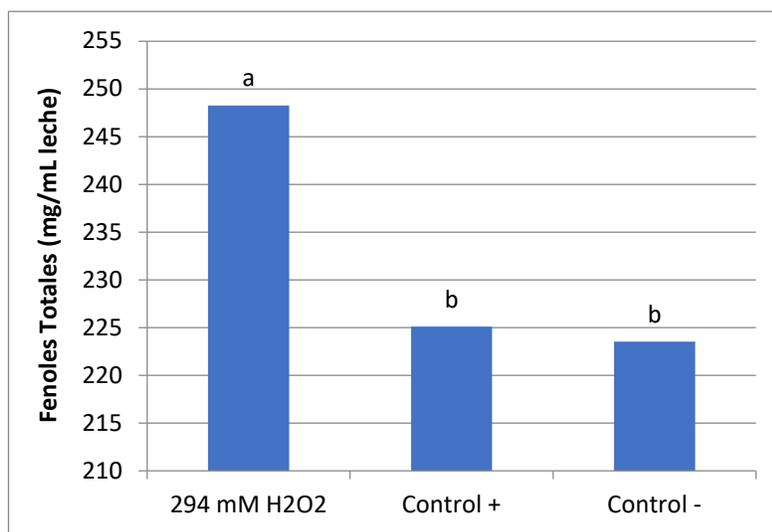


Figura 14. Fenoles totales en leche de cabra; animales alimentados con alfalfa elicitada a 294 mM de  $H_2O_2$  con 3 aplicaciones. Grupos control alimentados con alfalfa sin elicitación, Control +; alfalfa con proceso de producción similar a alfalfa elicitada pero sin aplicación de  $H_2O_2$ . Control -; alfalfa producida en otra parcela diferente sin aplicación de  $H_2O_2$  (a, b, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

### VI.3.2. Taninos condensados

Referente al tema de taninos condensados, no hubo diferencia significativa respecto al grupo control como se observa en la Figura 15. Los taninos condensados son compuestos de importancia ya que interaccionan con proteínas formando complejos y a su vez hacen que de acuerdo a la capacidad de unión entre tanino-proteína se genere inhibición de la actividad microbiana. La inhibición microbiana resulta de la interacción

de los taninos condensados con elementos de la pared celular microbiana, provocando una interacción indirecta con nutrientes generando que no se encuentren disponibles para los microorganismos (Smith, Zoetendel y Mackie., 2005). Los taninos condensados se encuentran como un componente nutracéutico de los alimentos proporcionando beneficios a la salud como prevención de enfermedades en los seres humanos y el ganado, esto en proporciones de 2 a 4% de materia seca (MS), previniendo infecciones y aumentando la digestión de nitrógeno no amónico y de los aminoácidos esenciales en el rumen del animal (Scribano, 2012). En cantidades altas de consumo (>7% MS) causan problemas como la reducción de la digestión del alimento, inhibición del crecimiento y problemas con la actividad de los microorganismos del rumen (Naumann et al., 2013). Mientras en concentraciones (<6% MS) han demostrado efectos positivos en los herbívoros como el incremento de peso y la producción e la leche (Min et al., 2003).

En este experimento los taninos condensados encontrados en la leche de cabra de animales tratados pueden depender de la cantidad de taninos condensados encontrados en la planta de alfalfa elicitada a 294 mM con 3 aplicaciones como se muestra en la Figura 15, donde la alfalfa elicitada contiene significativamente mayor cantidad de taninos condensados que el grupo control (ver anexo).

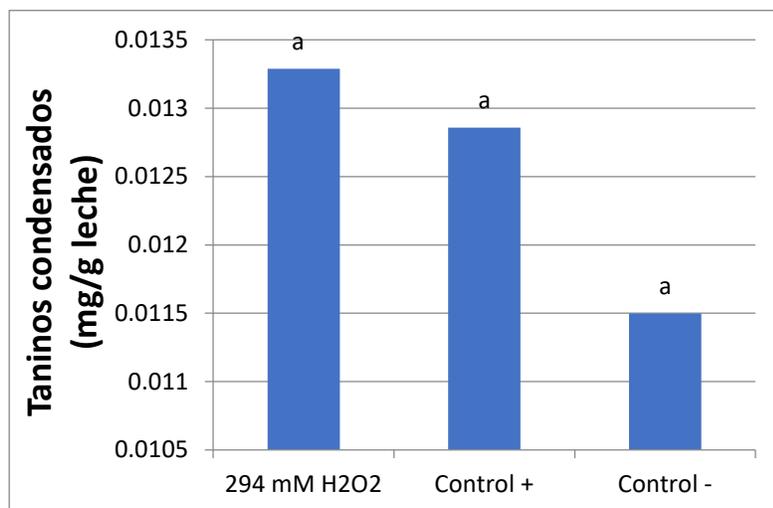


Figura 15. Taninos condensados en leche de cabra; animales alimentados con alfalfa elicitada a 294 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 3 aplicaciones. Grupos control alimentados con alfalfa sin elicitación, Control +; alfalfa con proceso de producción similar a alfalfa elicitada pero sin aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Control -; alfalfa producida en otra parcela diferente sin aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a, b, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

### VI.3.3. Capacidad Antioxidante (ABTS y DPPH)

Referente a la capacidad antioxidante cabe hacer mención que los metabolitos antioxidantes evaluados por la radical DPPH en el grupo tratado con alfalfa elicitada son superiores significativamente al grupo control, confiriendo valor nutracéutico a la leche, mientras que por el radical ABTS no hubo diferencia significativa respecto al grupo control.

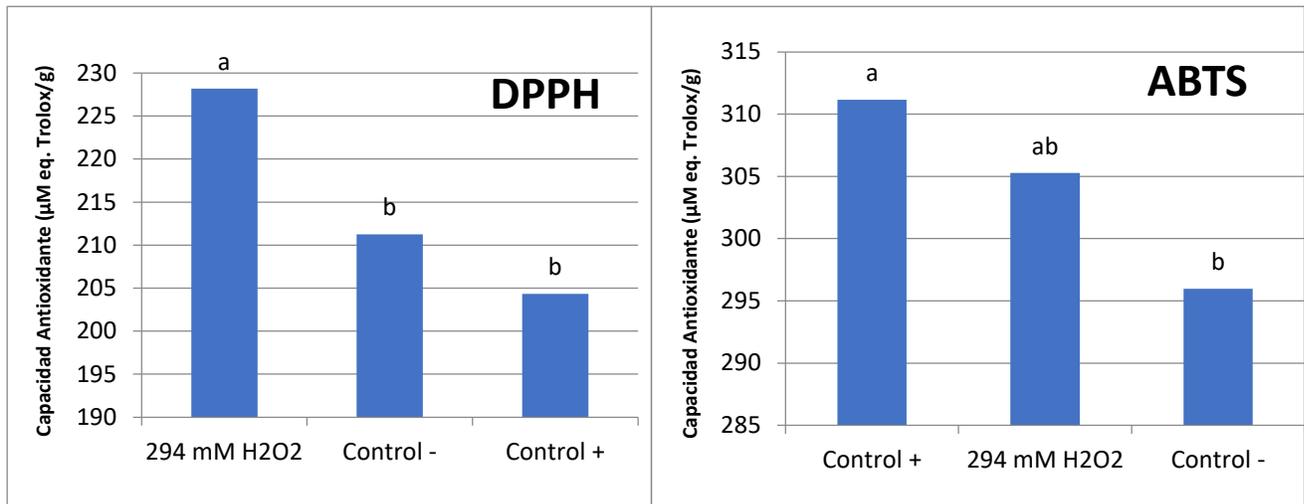


Figura 16 y 17. Capacidad antioxidante en leche de cabra (ABTS, DPPH); animales alimentados con alfalfa elicitada a 294 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 3 aplicaciones. Grupos control alimentados con alfalfa sin elicitación, Control +; alfalfa con proceso de producción similar a alfalfa elicitada pero sin aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Control -; alfalfa producida en otra parcela diferente sin aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a, b, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

## VII. CONCLUSIONES

Los resultados generados en esta investigación sugieren que la elicitación controlada con  $H_2O_2$  en la alfalfa induce efectos significativos en sus variables de sobrevivencia, en la actividad de enzimas antioxidantes y en algunos metabolitos secundarios de la planta. Además, se detectó que el mayor consumo de alfalfa se vio reflejado en los animales tratados con alfalfa elicitada. En lo concerniente a la leche de las cabras alimentadas con forraje elicitado hubo una mayor cantidad de fenoles y probablemente por ello una mayor capacidad antioxidante. En función de lo anterior se puede inferir que se cumplió la hipótesis de esta investigación.

## VIII. PERSPECTIVAS

1. Evaluación de variables bioquímicas como ácidos grasos, péptidos bioactivos en la leche de cabra.
2. Evaluación de variables fisiológicas en la planta de alfalfa.
3. Aumentar el número de animales para el proceso experimental.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Agrifood Information Service (SIAP). 2011. Producers of meat and goat's milk.
- Agudelo GA, Bedoya MO. 2005. Composición Nutrimental de la leche de ganado vacuno. *Rev Lasallista Invest.* 2: 38-42.
- Albenzio M, Santillo A, Ciliberti MG, Figliola L, Caroprese M, Marino R, Polito AN. 2016. Milk from different species: Relationship between protein fractions and inflammatory response in infants affected by generalized epilepsy. *J Dairy Sci.* 99:5032-5038.
- Almaas H, Cases AL, Devold TG, Holm H, Langsrud T, Aabakken L, et al. 2006. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *Int Dairy J.* 16:961-968.
- Amigo L, Fontecha J. 2011. Goat milk. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. Mcsweeney (Eds.). *Encyclopedia of dairy sciences* (2nd ed.). London, UK: Elsevier Ltd 3:484-493.
- Andrade CA, de Souza KR, de Oliveira Santos M, da Silva DM, Alves JD. 2018. Hydrogen peroxide promotes the tolerance of soybeans to waterlogging. *Sci Hortic.* 232: 40-45.
- Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C. 2002. Plant Breeding and Drought in C<sub>3</sub> Cereals: What should we breed for?. *Annals of Botany.* 89(7): 925-940.
- Aro A, Männistö S, Salminen I, Ovaskainen M.L, Kataja V, Uusitupa M. 2000. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr Cancer.* 38:151–157.

- Ashfaque F, Khan MIR, Khan NA. 2014. Exogenously applied H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promotes proline accumulation, water relations, photosynthetic efficiency and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *Annu Res Rev Biol.* 4:105-120.
- Atkin OK, Macherel D. 2008. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *103(4):* 581-597.
- Avalos CR, Chávez RMG. 2008. Guía para el manejo de rebaños Caprinos. Baja California Sur. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste campo experimental todos santos.
- Bagheri M, Gholami M, Baninasab B. 2019. Hydrogen peroxide-induced salt tolerance in relation to antioxidant systems in pistachio seedlings. *Sci Hortic* 242: 207-213.
- Barlowska M, Szwajkowska Z, Litwińczuk J, Król J. 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Compr Rev Food Saf.* 10: 292-302.
- Bezerra RM, Costa FGP, Givisiez PEN, Freitas ER, Goulart CC, Santos RA et al. 2016. Effect of L-glutamin acid supplementation on performance and nitrogen balance of broilers fed low protein diets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 100(3): 590-600.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol.* 30: 239-264.

- Chaves MM, Oliveira MM. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot.* 55: 2365-2384.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany.* 103(4): 551-560.
- Chávez-Servín JL, Andrade-Montemayor HM, Velázquez VC, Aguilera BA, García-Gasca T, Ferríz MRA, Olvera RAM, De la Torre-Carbot K. 2018. Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Rumin Res.* 160: 54-58.
- Chen Y, Gong X, Li G, Lin M, Huo Y, Li S, Zhao G. 2016. Effects of dietary alfalfa flavonoids extraction on growth performance, organ development and blood biochemical indexes of Yangzhou geese aged from 28 to 70 days. *Animal Nutrition.* 2(4): 318-322.
- Cheeseman JM. 2007. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress.* 1: 4-15.
- Clark S, García MB. 2017. A 100-year review: Advances in goat milk research. *J Dairy Sci.* 100(12):10026–10044.
- Clark S, Mora MG. 2017. A 100-year review: Advances in goat milk research. *J Dairy Sci.* 100(12): 10026–10044.
- Cuchillo HM, Puga DC, Wrage N, Pérez-Gíl RF. 2009b. Feeding regime and pasteurization impact on gross chemical composition and fatty acids content of goats' milk and soft cheese. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* Submitted.

- De Feo V, Quaranta E, Fedele V, Claps S, Rubino R, Pizza C. 2006 Flavonoids and terpenoids in goat milk in relation to forage intake. *Italian J Food Sci.* 1. 85-92.
- Deshpande S, Cheryan M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J Food Sci.* 52(2): 332-334.
- Dixon R, Sumner LW. 2003. Legume Natural Products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology.* 131(3): 878-885.
- Elwood PC, Pickering JE, Givens D, Gallacher JE. 2010. The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: An overview of the evidence. *Lipids.* 45(10): 925–939.
- Evans ME, Brown J.M, McIntosh MK. 2002. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem.* 13: 508–516.
- FAO. 2015. FAOSTAT: Statistics division. food and agriculture organization of the United Nations 2010. Available from: <http://faostat.fao.org/>. Accessed 2015 July 31.
- FAO Dairy Animals In. 2016.
- FAOstat. Food and Agriculture Organization of the United Nations database. (From Retrieved October 10. 2018).
- Formiga de Sousa YR, Vasconcelas MAS, Costa RG, Filho CAA, Paiva EPP, Queiroga RCRE. Sialic acid content of goat milk during lactation. *Livest Sci.* 177:175-180.
- Frelich J, Šlachta M, Hanuš O, Špička J, Samková E, Weglarz A. 2012. Seasonal variation in fatty acid composition of cow milk in relation to the feeding system. *Anim Sci Pap Rep.* 30: 219–229.

- Fukumoto LR. y Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 48(8): 3597-3604.
- Gallego-Giraldo L, Escamilla-Treviño L, Jackson LA, Dixon RA. 2011. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. *PNAS.* 108(51): 20814-20819.
- Gallego-Giraldo L, Jikumaru Y, Kamiya Y, Tang Y, Dixon RA. 2011. Selective lignin downregulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa L.*). *New Phytol* 190: 627-639.
- Galina MA, Osnaya F, Cuchillo HM, Haenlein GFW. 2007. Cheese quality from milk of grazing or indoor fed Zebu cows and Alpine crossbred goats. *Small Rumin Res.* 71: 264-272.
- Gao J. 2006. The Guidance of plant physiology experiments. Higher Education Press. Beijing.
- Gatouillat G, Alabdul MA, Bertin E, Okiemy-Akeli MG, Morjani H, Lavaud C, Madoulet C. 2014. Cytotoxicity and apoptosis induced by alfalfa (*Medicago sativa*) leaf extracts in sensitive and multidrug-resistant tumor cells. *Nutrition and Cancer.* 66(3): 483-491.
- Gobba CF, Espejo-Carpio J, Skibsted LH, Otte J. 2014. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *Int Dairy J.* 39(1): 28-40.
- Gobbetti M, Minervini F, Rizello CG. 2007. Bioactive peptides in Dairy Products. *Handbook of Food Products Manufacturing.* John Wiley & Sons, Inc.
- Haenlein GFW. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res.* 51:155-163.

- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. 16: 33–50.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Hakeem KR, Ozturk M, Fujita M. 2015. Arsenic toxicity in plants and possible remediation. *Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges*. 433-501.
- Hossain MA, Fujita M. 2013. Hydrogen peroxide priming stimulates drought tolerance in mustard (*Brassica juncea L.*) seedlings. *Plant Gene Trait*. 41.
- Hosseini SE, Wahid MA. 2016. Hydrogen Production from renewable and Sustainable energy resources: Promising Green energy carrier for clean development. *Renew Sust Energ Rev*. 57: 850-866.
- Jóźwik A, Strzałkowska N, Bagnicka E, Łagodziński Z, Pyzel B, Chyliński W. 2010. The effect of feeding linseed cake on milk yield and milk fatty acid profile in goats. *Anim Sci Pap Rep* 28: 245–251.
- Khan MIR, Khan NA, Masood A, Per TS, Asgher M. 2016. Hydrogen peroxide alleviates nickel-inhibited photosynthetic responses through increase in use-efficiency of nitrogen and sulfur, and glutathione Production in mustard. *Front Plant Sci*. 7: 44.
- Khan TA, Qazi F, Mohammad Y. 2018. Effect of exogenously sourced hydrogen peroxide treatments on growth, photosynthesis and antioxidant traits in two contrasting cultivars of tomato, a mode and concentration dependent study. *Acad J Agric Res*. 6(1): 19-29.
- Khedia J, Agarwal P, Agarwal PK. 2019. Deciphering hydrogen peroxide-induced signalling towards stress tolerance in plants. *3 Biotech*. 9(11): 395.

- Keles G, Yildiz-Akgul F, Kocaman V. 2017. Performance and milk composition of dairy goats as affected by the dietary level of stoned olive cake silages. *Asian-Australas. J Anim Sci.* 30:363-369.
- Kiraz AB. 2011. Determination of relative feed value of some legume hays harvested at flowering stage. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* 6(5): 525-530.
- Kumar YA, Singh J, Kumar YS. 2016. Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: A review. *Asian J Dairy Food Res.* 35(2): 96-102.
- Kuzniak E, Urbanek H. 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiologiae Plantarum.* 22: 195-203.
- Lamb JFS, Sheaffer CC, Samac DA. 2003. Population density and harvest maturity effects on leaf and stem yield in alfalfa. *Agron J.* 95:635-641.
- Lamb JFS, Hans-Joachim GJ, Riday H. 2012. Harvest impacts on alfalfa stem neutral detergent fiber concentration and digestibility and cell wall concentration and composition. *Crop Sci.* 52(5): 2402-2412.
- Lara MCR, Jurado GP. 2014. Paquete tecnológico para producir alfalfa en el estado de Chihuahua. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Norte Centro, Sitio experimental La Campana. Folleto técnico número 52.
- Lawlor DW, Tezara W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: A critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany.* 103(4): 561-579.

- Li P, Ji S, Hou C, Tang H, Wang Q, Shen Y. 2016. Effects of chemical additives on the fermentation quality and N distribution on alfalfa silage in south of China. *Anim Sci J.* 87(12): 1472-1479.
- Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulias J, Flexas J. 2002. Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought the interest of stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany.* 89: 895-905.
- Mellado M. 1997. La cabra criolla en America Latina. *Vet Mex.* 28(4): 333-43.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews.* 52: 673–751.
- Mielmann A. 2013. The utilisation of lucerne (*Medicago sativa*): a review. *Br Food J.* 115: 590-600.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim Feed Sci Tech.* 106: 3-19.
- Mozzetti C, Ferraris L, Tamietti G, Matta A. 1995. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions and markers of incompatibility in different Phytophthora-pepper interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 46(2): 95-107.
- Muñoz SF, Andrade MHM, De la Torre CK, Duarte VMA, Silva JJC. 2022. Comparative analysis of the protein composition of goat milk from French Alpine, Nubian, and Creole breeds and Holstein Friesian cow milk: Implications for early infant nutrition. *Animals.* 12(2236): 2-11.

- Muñoz-Salinas F. 2016. Comparación del perfil proteínico de leche de cabra de tres razas (Alpino Francés, Nubio y Criollo) con leche bovina Holstein (tesis de maestría). México: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Muñoz SF, Tovar PEG, Guevara GRG, Loarca PGF, Torres PI. 2021. Effect of hydrogen peroxide pretreatment on physiological and biochemical variables during germination of alfalfa seeds. *Legume Research-An International Journal*. 44:1506-1511.
- Naderi S, Rezaei HR, Taberlet P, Zundel S, Rafat SA, Naghash HR et al. 2007. Large-Scale Mitochondrial DNA. Analysis of the Domestic Goat Reveals Six Haplogroups with High Diversity *PLoS One*. 2(10): 1-12.
- Naumann HD, Muira JP, Lambert BD, Tedeschi LO, Kothmanne MM. 2013. Condensed tannins in the ruminant environment: A Perspective on Biological Activity. *J Agric Sci*. 1(1): 8-20.
- Nazir F, Hussain A, Fariduddin Q. 2019a. Interactive role of epibrassinolide and hydrogen peroxide in regulating stomatal physiology, root morphology, photosynthetic and growth traits in *Solanum lycopersicum L.* under nickel stress. *Environ Exp Bot*. 162: 479-495.
- Nazir F, Hussain A, Fariduddin Q. 2019b. Hydrogen peroxide modulates photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plants under copper stress. *Chemosphere* 230: 544-558.
- Nazir F, Fariduddin Q, Khan TA. 2020. Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. *Chemosphere*. 252.

- Nenadis NW, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using ABTS (\*+) assay. *J Agric Food Chem.* 52(15): 4669-4674.
- Nunez-Sanchez N, Martínez-Marin AL, Polvillo O, Fernandez-Cabañas VM, Carrizosa J, Urrutia B, et al., 2016. Near infrared spectroscopy (NIRS) for Determination of milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chem.* 190: 244-252.
- Organización Mundial de la Salud OMS. 2011. *Obesidad y Sobrepeso.*
- Park YW. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rumin Res.* 14: 151-159.
- Park YW. 2006. Goat milk-chemistry and nutrition. In: *Handbook of milk of non-bovine mammals.* Park YW and Haenlein GFW. Blackwell Publishers. 1st ed. Ames, Iowa and Oxford, England. 34-58.
- Park Y. 2009. Conjugated linoleic acid (CLA): good or bad trans fat. *J Food Comp Anal.* 22: 4–12.
- Pulina G, Milán MJ, Lavín MP, Theodoridis A, Morín E, Capote J, Caja G. 2018. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *J Dairy Sci.* 101(8): 6715-6729.
- Pickering AM, Linder RA, Zhang H, Forman HJ, Davies KJ. 2012. Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 alpha-beta regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J Biol Chem.* 287: 10021-10031.
- Qureshi MS, Jan S, Mushtaq A, Rahnman IU, Jan M, Ikramllah M. Effect of age on milk fatty acids in dairy buffaloes. *J Anim Plant Sci.* 22(2): 108-112.

- Ranadheera CS, Naumovski N, Ajlouni S. 2018. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. *Current Opinion in Food Science* 22: 109–114.
- Rinehart L. 2008. Nutrición para rumiantes en Pastoreo. *ATTRA*. 1: 3-20.
- Ruiz-Terán F, Medrano-Martínez A, Navarro-Ocaña A. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. *African J Biotech*. 7(12): 1886-1893.
- Sanders I, Sukharnikov L, Najar FZ, Roe BA. 2011. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer Berlin Heidelberg.
- Saroha V, Kumar D, Sharma A, Jayakumar S, Tyagi AK, Nagda RK, Dixit SP. Quantitative analysis of fatty acid in Indian goat milk and its composition with other livestock. *J Livest Sci*. 5: 1-8.
- Selvaggi M, Laudadio V, Dario C, Tufarelli V. 2014a. Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: an useful tool for dairy production. *J Sci Food Agric* 94: 3090–9.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*.
- Scribano V. 2012. Pastoreo de Leucaena en el control de parásitos. *Producir XXI*, Bs. As. 20(252): 12-18.
- Sheaffer CC, Martin NP, Lamb JFS, Cuomo GR, Jewett JG, Quring SR. 2000. Leaf and Stem Properties of Alfalfa Entries. 92(4): 733-739.
- Slacanac V, Bozanic R, Hardi J, Szabó JR, Lucan M, Krstanovic. 2010. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *Int J Dairy Technol*. 63:1-19.

- Small E. 2011. Alfalfa and relatives: Evolution and classification of *Medicago*. NRC. Res Press Ottawa.
- Smith AH, Zoetendal E, Mackie RI. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*. 50: 197-205.
- Steele KP, Ickert-Bond SM, Zarre S, Wojciechowski MF. 2010. Phylogeny and character evolution in *Medicago* (Leguminosae): Evidence from analyses of plastid *trnK/matK* and nuclear *GA3ox1* sequences. 97(7): 1142-1155.
- Swieca M. 2015. Production of ready-to-eat lentil sprouts with improved antioxidant capacity: Optimization of elicitation conditions with hydrogen peroxide. *Food Chemistry*. 180: 219-226.
- Szumacher-Strabel M, Cieślak A, Zmora P, Pers-Kamczyc E, Bielińska S, Stanisław M. 2011. *Camelina sativa* cake improved unsaturated fatty acids in ewe's milk. *J Sci Food Agric*. 91: 2031–2037.
- Taga MS, Miller EE, Pratt, DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*. 61(5): 928-931.
- Tava A, Avato P. 2006. Chemical and Biological Activity of triterpene saponins from *Medicago* species. *Natural Product Communications*. 1(12): 1159-1180.
- Van Arendonk JAM. 2011. Opportunities for animal breeding to meet the challenges of the future. *Nauka Przyr Technol*. 5: 30.
- Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P. 2001. Concentration and distribution of sialic acid in human milk vs infant formulas. *Am J Clin Nutr*. 74:510-515.

- Wang X, Hou C, Liu J, He W, Nan W, Gong H, Bi Y. 2013. Hydrogen peroxide is involved in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) tolerance to salt stress. *Acta Physiol Plant.* 35: 891-900.
- Weston LA, Mathesius U. 2013. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, including Allelopathy. *J Chem Ecol.* 39: 283-297.
- Yangilar F. 2013. The application of dietary fibre in Food industry: Structural features, Effects on health and definition, obtaining and analysis of dietary fibre: A review. *J Food Nutri Res.* 1(13): 13-23.
- Yari M, Valizadeh R, Naserian AA, Jonker A, Yu P. 2012. Modeling nutrient availability of alfalfa hay harvested at three stages of maturity and in the afternoon and morning in dairy cows. *Anim Feed Sci Tech.* 178(1): 12-19.
- Zenebe T, Ahmed N, Kabeta T, Kebede G. 2014. Review on medicinal and nutritional values of goat milk. *Acad J Nutr.* 3(3):30-39.
- Zhang J, Klueva NY, Wang Z, Wu R, Ho TD, Nguyen HT. 2000. Genetic engineering for abiotic stress. *In Vitro Cell Dev Biol.* 36: 108-114.
- Zhan J, Liu M, Su X, Zhan K, Zhang C, Zhao G. 2017. Effects of alfalfa flavonoids on the production performance, immune system and ruminal fermentation of dairy cows. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 30(10): 1416-1424.
- Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM. 2011. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90(4): 1229-1239.

## X. ANEXOS

Determinación de metabolitos secundarios en alfalfa elicitada con peróxido de hidrógeno 294 mM con 3 aplicaciones.

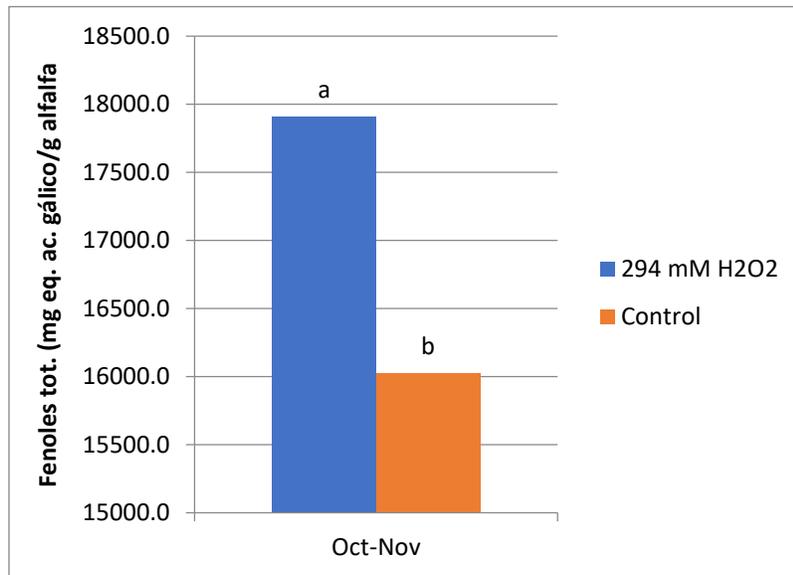


Figura 18. Fenoles totales en alfalfa elicitada a 294 mM de peróxido de hidrógeno. Temporada de cultivo de Octubre a Noviembre (a, b, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

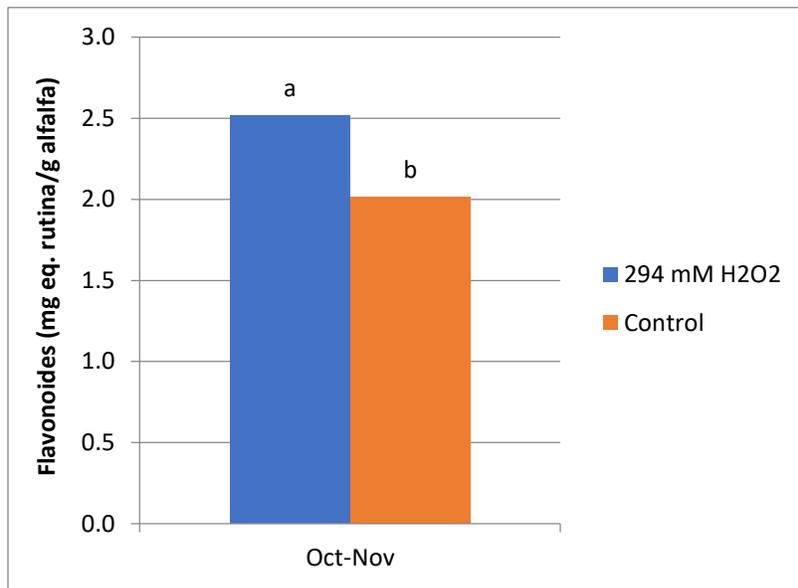


Figura 19. Flavonoides en alfalfa elicitada a 294 mM de peróxido de hidrógeno. Temporada de cultivo de Octubre a Noviembre (a, b, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

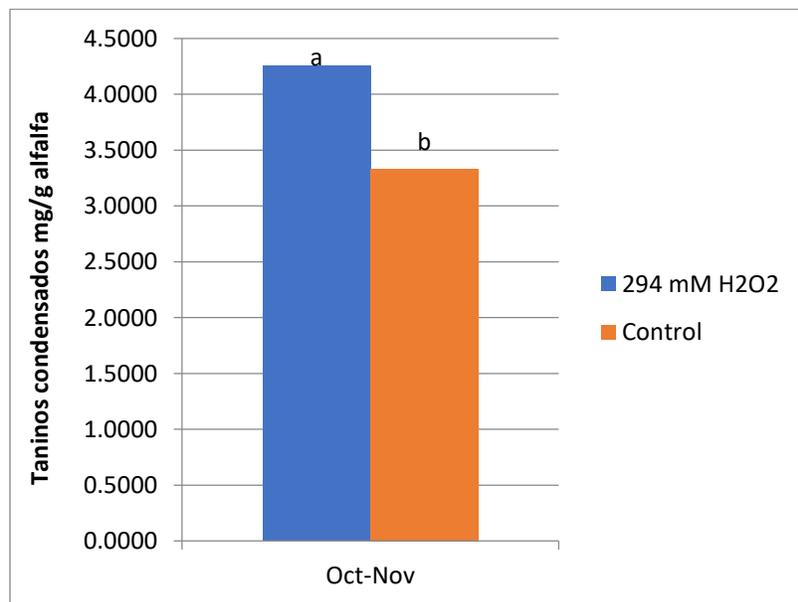


Figura 20. Taninos condensados en alfalfa elicitada a 294 mM de peróxido de hidrógeno. Temporada de cultivo de Octubre a Noviembre (a, b, observa la diferencia estadística significativa con  $\alpha=0.05$ ).

*Mi mensaje es.....*

*ME ENCANTO ESTUDIAR*

*Y*

*NUNCA ES TARDE PARA APRENDER*