

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**EFEECTO ANTIOXIDANTE DE LA BORRA DE CAFÉ EN
LA CALIDAD DE SEMEN FRESCO DE GANADO
BOVINO**

Autor:

Bach. Deiner Jhonel Gongora Bardales

Asesores:

M. Sc. Gleni Tatiana Segura Portocarrero

Ms. Marilu Mestanza Mendoza

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2024

DEDICATORIA

A Dios, quien ha sido mi guía y fortaleza para alcanzar mis objetivos

A mis padres por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida y por ser mi inspiración para el cumplimiento de mis objetivos.

A mis hermanas por todo su apoyo que me brindan constantemente.

A todos mis familiares por apoyarme día con día y por guiarme siempre en el camino del bien.

A mis amigos por su apoyo incondicional durante mi formación profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios todopoderoso por darme la vida.

Agradezco a mis padres por sus consejos, por su trabajo arduo y por ser mi soporte y apoyo en mi formación como profesional, y al apoyo que me brindan día por día a mis hermanas.

A mis asesoras, M. Sc. Gleni Tatiana Segura Portocarrero y Ms. Marilu Mestanza Mendoza por la dedicación de tiempo y guía para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

Expreso mi gratitud hacia todas aquellas personas que colaboraron en la elaboración de este trabajo de investigación.

Al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología por el apoyo para el desarrollo de la presente tesis, así mismo agradezco al Laboratorio de Calidad de Café por brindarme las facilidades de acceso a sus instalaciones.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas y a los docentes de la FIZAB, por brindarme la oportunidad de desarrollarme como profesional.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph. D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

Rector

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

Vicerrector Académico

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOSA

Vicerrectora de Investigación

Dr. HÉCTOR VLADIMIR VÁSQUEZ PÉREZ

Decano de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Efecto antioxidante de la barra de café en la calidad de semen fresco de gonado bovino

del egresado Denner Jhonel Gongora Bardales
de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología,
Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista
de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 29 de mayo de 2024

Firma y nombre completo del Asesor
M. Sc. Gleni Tatiana Segura Portocarrero



VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Efecto antioxidante de la borra de café en la calidad de semen fresco de ganado bovino

del egresado Deiner Jhonel Gongora Bardales
de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología
Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista
de esta Casa Superior de Estudios.

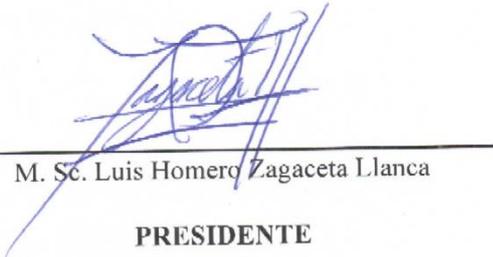
El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 29 de mayo de 2024

Firma y nombre completo del Asesor
Ms. Marilu Mesanza Mendoza



JURADO EVALUADOR



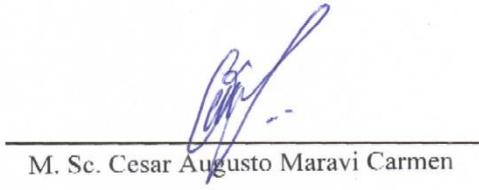
M. Sc. Luis Homero Zagaceta Llanca

PRESIDENTE



Dr. Hugo Prías Torres

SECRETARIO



M. Sc. Cesar Augusto Maravi Carmen

VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Efecto antioxidante de la borra de café en la
calidad de semen fresco de ganado bovino

presentada por el estudiante ()/egresado (X) Deiner Jhonel Gongora Bardales

de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista

con correo electrónico institucional 1587896581@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 22 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 11 de junio del 2024


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

REPORTE DE TURNITIN

EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LA BORRA DE CAFÉ EN LA CALIDAD DE SEMEN FRESCO DE GANADO BOVINO

INFORME DE ORIGINALIDAD

| | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| 22% INDICE DE SIMILITUD | 22% FUENTES DE INTERNET | 9% PUBLICACIONES | 6% TRABAJOS DEL ESTUDIANTE |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | repositorio.untrm.edu.pe Fuente de Internet | 3% |
| 2 | hdl.handle.net Fuente de Internet | 3% |
| 3 | revistas.unne.edu.ar Fuente de Internet | 2% |
| 4 | www.scielo.org.ar Fuente de Internet | 2% |
| 5 | repositorioubasibbi.uba.ar Fuente de Internet | 1% |
| 6 | docslib.org Fuente de Internet | 1% |
| 7 | repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 8 | vitae.ucv.ve Fuente de Internet | 1% |
| 9 | www.coursehero.com Fuente de Internet | |

Fajardo
Luis Homero Fajardo Uanica.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



ANEXO 3-5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 02 de Julio del año 2024, siendo las 09:25 horas, el aspirante: Deiner Jhonel Gongora Bardales, asesorado por M.Sc. Glori Tatiana Segura Portocarrero y M.S. Marilu Mestanza Mendoza defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: "Efectos Antioxidante de la Borra de Café en la Calidad de Seman Fresco de Ganado Bovino" para obtener el Título Profesional de Ingeniero Zootecnista, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: M.Sc. Luis Homero Zagaceta Llanca

Secretario: Dr. Hugo Friar Torres

Vocal: M.Sc. Cesar Augusto Maravi Carmen

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 10:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTO | iii |
| AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS | iv |
| VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS | v |
| VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS | vi |
| JURADO EVALUADOR | vii |
| CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS | viii |
| REPORTE DE TURNITIN | ix |
| ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS | x |
| ÍNDICE DE TABLAS | xiii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xiv |
| ÍNDICE DE ANEXOS | xv |
| RESUMEN | xvi |
| ABSTRACT | xvii |
| I. INTRODUCCIÓN | 18 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 2.1. Aprobación ética | 21 |
| 2.2. Lugar de ejecución..... | 21 |
| 2.3. Obtención de la borra de café bourbon..... | 22 |
| 2.4. Extracción de compuestos bioactivos de la borra de café..... | 22 |
| 2.5. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos | 23 |
| 2.6. Concentración adecuada de borra de café para mantener la calidad espermática bovina..... | 24 |
| III. RESULTADOS | 29 |
| IV. DISCUSIÓN | 36 |

| | |
|--------------------------------------------|-----------|
| V. CONCLUSIONES | 39 |
| VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 40 |
| ANEXOS..... | 46 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Valores de los ensayos para determinación de antioxidantes y fenoles | 29 |
| Tabla 2. Características seminales de los eyaculados colectados | 29 |
| Tabla 3. Valores promedios de motilidad espermática obtenidos según dosis aplicada.. | 30 |
| Tabla 4. Valores de motilidad espermática obtenidos respecto al tiempo de evaluación | 30 |
| Tabla 5. Valores promedios de interacción de factores dosis x tiempo respecto a motilidad espermática | 31 |
| Tabla 6. Valores promedios de parámetros cinéticos respecto a dosis..... | 31 |
| Tabla 7. Valores promedios de parámetros cinéticos respecto al tiempo de evaluación | 32 |
| Tabla 8. Valores promedios respecto a los parámetros cinéticos evaluados..... | 33 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ubicación geográfica de área de desarrollo..... | 22 |
| Figura 2. Valores promedios de la interacción de la dosis x tiempo respecto a la funcionalidad de membrana..... | 34 |
| Figura 3. Valores promedios de la interacción de la dosis x tiempo respecto a la integridad acrosomal..... | 34 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1. Obtención, secado y almacenamiento de borra de café..... | 46 |
| Anexo 2. Preparación de los extractos de borra de café..... | 46 |
| Anexo 3. Extracción de antioxidantes por sonicador, centrifugado y filtrado de los extractos de borra de café..... | 47 |
| Anexo 4. Ensayos para determinar contenido de antioxidantes y fenoles totales en borra de café..... | 48 |
| Anexo 5. Colecta seminal por método vagina artificial..... | 48 |
| Anexo 6. Evaluaciones de parámetros seminales (pH, concentración, motilidad y parámetros cinéticos)..... | 49 |
| Anexo 7. Evaluación de integridad de acrosoma y funcionalidad de membrana de espermatozoides..... | 50 |
| Anexo 8. Evaluación de integridad de acrosoma y funcionalidad de membrana de espermatozoides..... | 51 |

RESUMEN

La ganadería es un sector económico crucial dedicado a la producción y reproducción animal, donde se han implementado diversas biotecnologías para mejorar su desarrollo. Por lo tanto, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antioxidante del producto liofilizado de borra de café (CGL) en el semen bovino refrigerado. Se recolectaron un total de 10 eyaculados utilizando el método de la vagina artificial, se diluyeron con Optixcell® y se asignaron al azar a diferentes dosis con CGL. El CGL se dividió en tres dosis (1, 1.5 y 2 mg CGL/ml DS) y un grupo control (sin adición de CGL). Las muestras se evaluaron en diferentes tiempos de refrigeración (4, 12, 24 y 36 horas a 4 °C), con cada tratamiento que implica la adición de 10 ml de semen. La funcionalidad de la membrana se evaluó mediante la prueba de hinchamiento hipoosmótico (HOST), y la integridad del acrosoma se evaluó mediante la tinción con Azul de Coomassie al 0.22%.

En la evaluación individual de factores (dosis y tiempo), se observó un efecto significativo principalmente para la dosis de 1 mg CGL/ml DS a las 4 horas. En la evaluación de la interacción de factores, la dosis de 1 CGL/ml DS mostró efectos significativos en la motilidad progresiva a las 4 y 12 horas, mientras que las dosis de 1.5 y 2 mg CGL/ml DS exhibieron efectos significativos solo a las 4 horas. Se observaron tendencias similares para los parámetros cinéticos, la funcionalidad de la membrana y la integridad del acrosoma. Por lo tanto, la adición de CGL al semen mejoró las características seminales debido a la presencia de antioxidantes, lo que permitió mantener valores óptimos hasta 4 horas después de la recolección del semen. Esto sugiere que un marco de tiempo de 4 horas es óptimo para la criopreservación para evitar un declive en las características seminales, considerando la fisiología biológica de los espermatozoides.

Palabras clave: Borra de café liofilizada, semen, características seminales, simmental, bovino.

ABSTRACT

Livestock farming is a crucial economic sector dedicated to animal production and reproduction, where various biotechnologies have been implemented to enhance its development. Therefore, this research aimed to evaluate the antioxidant effect of lyophilized coffee grounds product (CGL) on refrigerated bovine semen. A total of 10 ejaculates were collected using the artificial vagina method, diluted with Optixcell®, and randomly assigned to different doses with CGL. The CGL was divided into three doses (1, 1.5, and 2 mg CGL/ml DS) and a control group (without CGL addition). The samples were evaluated at different refrigeration times (4, 12, 24, and 36 hours at 4 °C), with each treatment involving the addition of 10 ml of semen. Membrane functionality was assessed using the hypoosmotic swelling test (HOST), and acrosome integrity was evaluated using 0.22% Coomassie Blue staining.

In the individual evaluation of factors (dose and time), a significant effect was observed primarily for the 1 mg CGL/ml DS dose at 4 hours. In the interaction evaluation of factors, the 1 CGL/ml DS dose showed significant effects on progressive motility at 4 and 12 hours, while the 1.5 and 2 mg CGL/ml DS doses exhibited significant effects only at 4 hours. Similar trends were observed for kinetic parameters, membrane functionality, and acrosome integrity. Thus, the addition of CGL to semen improved seminal characteristics due to the presence of antioxidants, enabling the maintenance of optimal values for up to 4 hours after semen collection. This suggests that a 4-hour timeframe is optimal for cryopreservation to prevent a decline in seminal characteristics, considering the biological physiology of spermatozoa.

Keywords: Coffee grounds lyophilized, semen, seminal characteristics, simmental, bovine.

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería tradicional peruana enfrenta problemas asociados a la productividad, derivado de problemas reproductivos tales como la dificultad en sincronización de celo, incompatibilidad reproductiva entre razas, bajas tasas de fecundación, cría estacional, defectos genéticos, propagación de enfermedades, entre otros. Por otro lado, hay un creciente interés a nivel mundial por conservar la biodiversidad genética dentro de las poblaciones de animales (Millones & Moran, 2019; Sánchez, 2023; Suanes *et al.*, 2021).

En ese sentido, las biotecnologías reproductivas desempeñan un papel de suma importancia en la ganadería, ya que ofrecen una serie de técnicas que permiten manipular la reproducción de los animales con el objetivo de mejorar su eficiencia reproductiva, genética y productividad; estas técnicas incluyen a la inseminación artificial, multiovulación, fertilización *in vitro*, transferencia de embriones, sexado del semen, etc. (Singh, *et al.*, 2022). Todas estas técnicas contribuyen a la propagación selectiva de animales con un gran valor genético, como la multiplicación rápida de líneas genéticas superiores; en ese sentido, se ha demostrado que estas biotecnologías reproductivas son eficientes para mejorar la producción de leche y carne, además para reducir los intervalos generacionales y minimizar las pérdidas económicas; además que cumplen un rol de suma importancia en la conservación de razas y especies autóctonas (Rosete *et al.*, 2021).

No obstante, el éxito en la implementación de estas biotecnologías está estrechamente relacionada con la calidad seminal, puesto que este desempeña un rol fundamental al contener los espermatozoides responsables de la fecundación y la posterior formación del embrión mediante su fusión con el óvulo, esto implica realizar diversas evaluaciones para determinar su calidad (Vallet-Buisan *et al.*, 2023). Además, es necesario emplear técnicas adecuadas de colecta seminal que se ajusten particularmente con cada animal que se trabaje (Valverde, 2021).

Por otro lado, en el contexto de la economía peruana, el café se ha convertido en uno de los principales productos agrícolas de exportación. Perú ocupa el primer lugar como productor y exportador de café orgánico junto con Etiopía, con una extensión de cultivo de 233 180 hectáreas en el año 2022, el cual representa el 7.8% de área agrícola nacional y alcanzando una producción de 231 184 toneladas el mismo año (Midagri, 2023).

A pesar de los múltiples beneficios que trae consigo esta producción, también genera una gran cantidad de residuos, mucho de los cuales no se utilizan en otros procesos y son desechados, causando daño al ecosistema. Entre estos residuos se encuentran la pulpa, el exocarpio y la borra, esta última se refiere a los granos de café tostados y molidos que han perdido parte de sus componentes solubles en agua, siendo los residuos sólidos obtenidos después de la preparación de bebidas de café (Franca & Oliveira 2019).

La borra se genera tanto en las instalaciones de fabricación de café soluble como durante la preparación de la bebida a partir de granos de café tostados y molidos. En general, este residuo se desecha directamente a la basura, y es altamente contaminante debido a sus elevadas concentraciones de sustancias orgánicas, que requieren grandes cantidades de oxígeno para descomponerse (Fernández-Cortés, *et al.*, 2020). Este problema ha llevado a investigaciones orientadas al aprovechamiento de estos residuos, como la producción de biogás, bioetanol, bioaceite y biocarbón, como fuentes de energía renovable; además, se ha explorado su uso en la alimentación animal (Yoplac, *et al.*, 2017; Mata, 2022);

Por otro lado, la presencia de compuestos antioxidantes en la composición del café está asociado a la presencia de antioxidantes (Erskine, *et al.*, 2022). Dado que los antioxidantes cumplen un rol de gran importancia en la inhibición de la oxidación causada por radicales libres, se ha investigado la presencia de estos compuestos en la borra de café. Cortes *et al.* (2017), determinaron la presencia de antioxidantes en subproductos de café (pulpa y borra), mediante el uso de un método de extracción sólido-líquido, demostrando que ambos subproductos contienen compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes.

Mussatto *et al.* (2011) utilizaron el método de extracción sólido – líquido con metanol como disolvente para extraer antioxidantes de la borra de café. Su estudio reveló una alta capacidad antioxidante de los compuestos (0,10 mM determinado mediante el ensayo del poder antioxidante reductor férrico). Los autores destacaron la importancia de estos antioxidantes en beneficio de la salud y resaltaron sus posibles aplicaciones; además sugirieron que el proceso de extracción podría optimizarse utilizando otros disolventes no tóxicos, lo que abordaría una preocupación importante asociada con este método de extracción.

Rojas & Cardona (2020) estudiaron el efecto de adicionar de borra de café a semen fresco humano; donde evaluaron el potencial de membrana mitocondrial, las propiedades

funcionales de los espermatozoides, y especies reactivas de oxígeno (ROS); estas muestras fueron incubadas por 2 horas a 37 °C, evaluando la movilidad espermática en microscopio cada 30 minutos; mediante las cuales observaron mejoras significativas en movilidad a partir de los 30 minutos de iniciado la incubación a las muestras que fueron agregadas borra de café en comparación con muestras control; además que incrementó el potencial de membrana mitocondrial en 14,4 % en comparada con el tratamiento control. Concluyeron que la borra de café impacta positivamente en la movilidad de espermatozoides e incrementen el potencial de la membrana mitocondrial. Los resultados alentadores de esta investigación dejan abierta las posibilidades de nuevas investigaciones en el área de la reproducción humana y animal. En este sentido el objetivo general fue evaluar el efecto antioxidante de la borra de café en la calidad de semen fresco de ganado bovino.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Aprobación ética

Durante la presente investigación, la salud e integridad del animal involucrado en este estudio fue salvaguardada, ya que las actividades han sido desarrolladas bajo las consideraciones éticas correspondientes según el protocolo IACUC (Institucional Animal Care and Use Committees). Asimismo, este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza en la ciudad de Chachapoyas, Perú (N° de aprobación CIEI-N° 0038).

2.2. Lugar de ejecución

Las colectas se realizaron en el Centro de Colecta de Semen de la Estación Experimental de Chachapoyas. Las evaluaciones de parámetros seminales fueron realizadas en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético ambas instalaciones pertenecen al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología (IGBI) como parte del proyecto SNIP: 346922 “Mejoramiento de Tecnologías para el Incremento de Núcleos de Ganado Bovino de alto valor genético en las Estaciones Experimentales Ganaderas de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza – PROTEGAN”. Asimismo, la obtención del liofilizado y evaluación del potencial bioactivo de la borra del café se realizó en el Laboratorio de Calidad de Café del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) ambos institutos integran a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas - UNTRM (Figura 1).

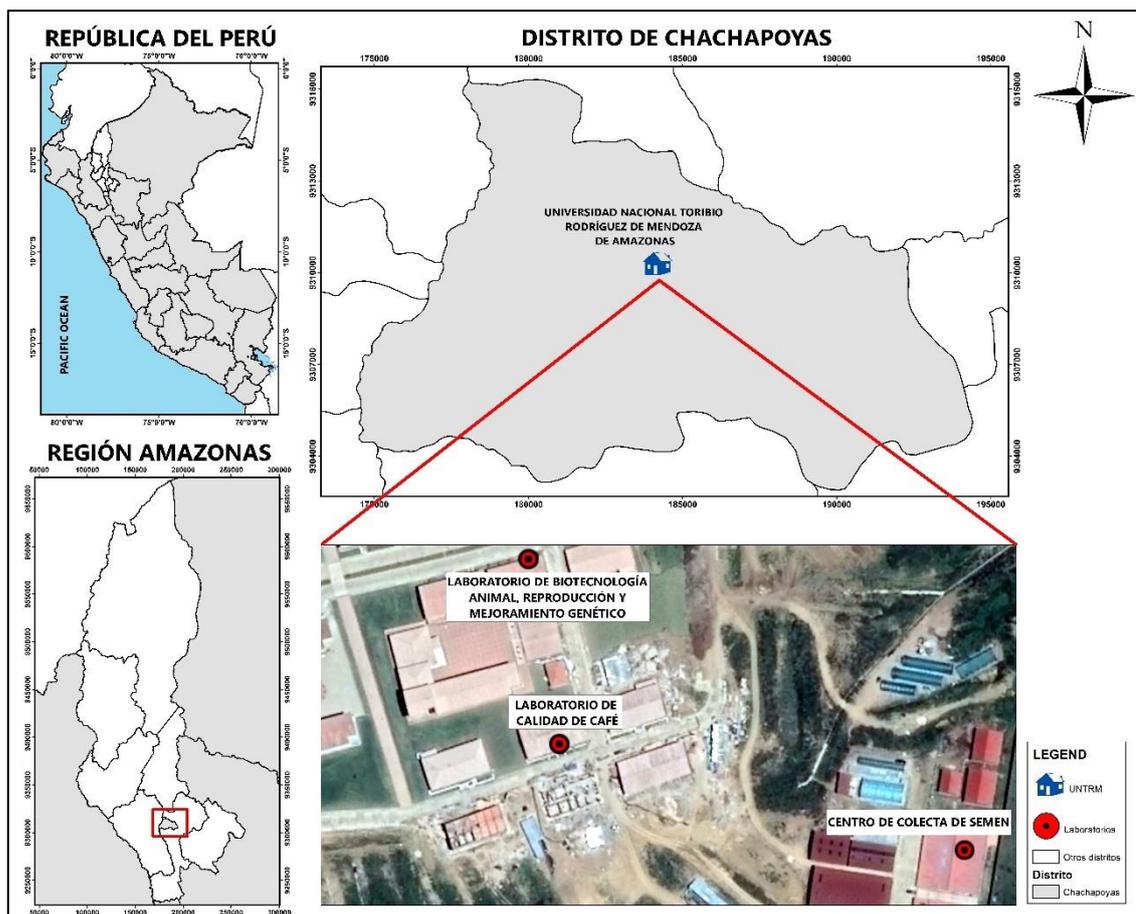


Figura 1. Ubicación geográfica de área de desarrollo del estudio

2.3. Obtención de la borra de café bourbon

Se trabajó con la borra de café de la variedad bourbon en Laboratorio de Calidad de Café, con muestras homogéneas en todos los procesos hasta obtener la borra.

La borra se secó en una estufa (Venticell, ECOline, Alemania) a 60 °C por 72 horas. Posteriormente, la borra de café fue triturada en un molino de aspas (BOSCH, TSM6A013B, Eslovenia) hasta tener partículas de tamaño uniforme, finalmente las muestras fueron cernidas en un cedazo (100 μ m) con el propósito de tener una muestra más homogénea y favorecer la extracción de los compuestos bioactivos.

2.4. Extracción de compuestos bioactivos de la borra de café

Los compuestos bioactivos de borra de café fueron extraídos siguiendo la metodología descrita por Myo & Khat-udomkiri (2022) con cambios menores; la extracción se hizo con agua MiliQ. Para la extracción se inició pesando 4.5 g de borra seca en un vaso de precipitado, donde se adicionó 100 ml de agua MiliQ (Sistema de purificación de agua ultrapura Milli-Q® IQ 7000) a 90 °C; se usó un agitador

magnético (Benchmark, HOTPLATE STIRRER, USA) por 5 minutos para favorecer la dilución solvente – borra, posteriormente las muestras fueron colocadas en un sonicador (Branson, CPX5800H-E, México) por un periodo de 10 minutos para mejorar la extracción. El extracto obtenido fue llevado a centrifugar (Centurion Scientific, PRO -ANALYTICAL CR4000, Alemania) a 4800 rpm por 10 minutos, y luego filtrado en papel Whatman N° 40, y colocándose la solución filtrada en tubos de centrifuga de 50 ml. Finalmente, las muestras fueron congeladas a -86°C (SNIJDERS LAB, VF360-86, Netherlands) por 72 horas y liofilizadas (Terroni, LC1500 con campana acrílica, USA) por un periodo de 3 días, obteniendo así el liofilizado de borra de café (LBC).

2.5. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos

a. Ensayo captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

La actividad antioxidante se determinó por el ensayo de captación del radical libre 2,2 – difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) desarrollada por Brand- Williams et al., 1995 y adaptado por Çelik & Gökmen (2018) para determinar la actividad antioxidante en el café, se pesó 20 mg de DPPH por litro de metanol para obtener una solución con absorbancia aproximada de 0,45. La solución de DPPH (3,9 ml) se colocó en una cubeta de vidrio para medir la absorbancia inicial (A_0) a una longitud de onda de 516 nm en un espectofotómetro UV/VIS. Posteriormente, se colocó 3,9 mL de solución DPPH en tubos de ensayo y se agregó 100 μ L de extracto de muestra, luego fueron mezclados en un vortex, para posteriormente ser colocadas en oscuridad por 10 minutos y finalmente ser medidos en el espectofotómetro (UV-VIS PEAK, T9200, USA) a 516 nm (Abs). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se informaron los valores medidos.

Los porcentajes de inhibición de DPPH se calcularán con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición. de DPPH} = \frac{(A_0 - A_T) - (A_s - A_T)}{A_0 - A_T} \times 100$$

Donde: A_0 : absorbancia de solución de DPPH

A_T : absorbancia de metanol

A_s : absorbancia del extracto de muestra

Se utilizó el estándar trolox para construir la curva de calibración en un rango de 0 a 1,0 mM y los valores se expresaron en miligramos de Trolox equivalente / 100 mg de liofilizado de borra de café (mg T Eq/ 100 mg LBC).

b. Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

Se usó el método establecido por Rufino *et al.* (2010) y Pulido *et al.* (2000) con modificaciones. La preparación del reactivo FRAP consistió en mezclar 25 mL de tampón de acetato 0,3 M, 2,5 mL de TPTZ 10 mM y 2,5 mL de cloruro férrico a 20 mM; Se mezcló 2,7 mL de solución FRAP con 270 µl de agua destilada y con 90 µl de borra de café, se homogenizó en un vortex y se incubó en una estufa por un periodo de 30 minutos a 37 °C. Finalmente se hizo la lectura a 593 nm en un espectrofotómetro UV/VIS. Se utilizó la solución FRAP como calibrador. La curva de calibración se construyó con sulfato ferroso (FeSO₄) en rango de 500 a 1000 µM y los valores se expresaron en mg de ácido gálico/100 mg LBC.

c. Fenoles totales

Los compuestos fenólicos se determinaron por medio del ensayo de colorimetría Folin - Ciocalteu, siguiendo el método desarrollado por Singleton *et al.* (1999). Se colocó 50 µl de extracto de cada una de las muestras en tubos de ensayo, seguidamente se agregó 1,5 ml de solución Folin acuoso con una concentración 1:10 v/v y por último se agregó 1,5 ml de Na₂CO₃ al 7,5% (diluido en agua desionizada). Se dejó en una estufa a 50° C por 5 minutos para su reacción. Con la ayuda de un espectrofotómetro UV/VIS se hizo la lectura de la absorbancia, a una longitud de onda de 765nm. La cuantificación de fenoles totales se obtuvo a partir de la curva de ácido gálico de 0,01 – 0,1 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico / 100 mg de LBC.

2.6. Concentración adecuada de borra de café para mantener la calidad espermática bovina

2.6.1. Animal de estudio

Se trabajó con un toro de la raza simmental de 3 años, perteneciente a la Estación Experimental de Chachapoyas de la UNTRM, alimentado con heno de alfalfa, ensilado de maíz chala y alimento balanceado, brindado en doble horario (mañana y tarde).

2.6.2. Análisis de datos

Se empleó el diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial 4x4, que incluyó 10 repeticiones (colectas) y un total de 160 unidades experimentales. Los factores evaluados fueron la dosis: control, 1, 1.5 y 2 mg LBC/ml SD (semen diluido) y el tiempo: 4, 12, 24 y 36 horas posteriores a la adición del LBC).

En el análisis estadístico, primeramente, se hizo un resumen de medias y desviación estándar de los datos obtenidos.

Se contrastó los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza a través de las pruebas de Shapiro Wilk y Levene; a las variables que cumplieron con ambos supuestos fueron evaluadas mediante un análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples de Duncan con un nivel de significancia del 95%: LIN: índice de linealidad (%) y ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ($\mu\text{m/s}$), funcionalidad de membrana (%) e integridad de acrosoma (%). Para los parámetros que no cumplieron con este supuesto: MT: motilidad total (%); MP: motilidad progresiva (%); VCL: Velocidad curvilínea(m/s); VAP: Velocidad medio (um/s); VSL: velocidad lineal (um/s); STR: índice de rectitud (%) y BCF: Frecuencia del batido de cola (Hz), se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico InfoStat v. 2018p.

2.6.3. Colección de semen

Se colectó un total de 10 eyaculados obtenidos cada 7 días por el método de vagina artificial, la misma que fue armada 20 minutos antes de la colecta con agua temperada a 60°C con la finalidad de que al momento de la colecta la temperatura interna esté a 38,5°C. Luego se comenzó con la estimulación del reproductor a través del olfateo y caminatas cercanas al chantador. Al momento del salto del toro, se procedió a colocar el pene dentro de la vagina artificial y una vez obtenido el eyaculado se llevó a laboratorio para hacer las evaluaciones y diluciones correspondientes.

2.6.4. Evaluaciones iniciales

El semen colectado se evaluó macroscópicamente volumen, color, olor y pH; y microscópicamente motilidad masal (MM) (0-5), esta última se evaluó mediante una valoración subjetiva del movimiento masivo de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990, como se cita en Segura *et al.*, 2023)

2.6.5. Dilución de semen

Se trabajó con dilutor comercial de la marca OptiXcell, el cual fue preparado según las indicaciones del fabricante, manteniéndolo a temperatura ambiente. Posterior a las evaluaciones iniciales del semen, se realizó la cuantificación espermática para una dilución en base a 25×10^6 espermatozoides por 0.5 ml (Fotómetro Minitube, SDM6 Printer, Alemania). La dilución se realizó de manera fraccionada, iniciando con una dilución 1/1 y posterior añadiendo dilutor al semen cada 10 minutos hasta alcanzar el volumen final de dilución, cabe resaltar que siempre se tuvo en cuenta la temperatura tanto del semen como del dilutor antes de cada dilución, la cual fue medida con una termocupla (DigiSense, 68X001351, USA), evitando alteraciones de los espermatozoides por estrés térmico.

Finalizada la dilución, se agregaron las dosis de liofilizado de borra de café (LBC), dividiéndolo en cuatro tratamientos: T0 (control), T1 (1 mg LBC/ml SD), T2 (1,5 mg LBC/ml SD) y T3 (2 mg LBC/ml SD); para cada tratamiento se utilizó 10 ml de SD.

2.6.6. Evaluaciones posteriores a la aplicación de tratamientos

Se hicieron evaluaciones de motilidad, parámetros cinéticos, funcionalidad de membrana e integridad de acrosoma a las 4h, 12h, 24h y 36 h posteriores a la adición de LBC.

a) Evaluaciones con el sistema CASA SCA®

Se evaluaron microscópicamente en el sistema computarizado de análisis seminal (SCA Evolution - Sperm Class Analyzer v.6.6.64, USA) para lo cual se sacó una muestra de 10 μ l y se colocó en una lámina portaobjetos, se cubrió con una laminilla cubreobjetos e hizo la medición en el sistema SCA®; se obtuvo los siguientes datos: motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP); parámetros cinéticos: velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), Velocidad lineal (VSL), índice de rectitud (STR), Índice de linealidad (LIN), amplitud de desplazamiento lateral de cabeza (ALH) y frecuencia de batido de cola (BCF).

b) Funcionalidad de membrana

Se utilizó la prueba hipoosmótica (HOST) adaptado de Jeyendran *et al.*, (1984); para lo cual se preparó una solución de 50 mOsm/L utilizando 0,1225 g de D-fructosa y 0,225 g de Citrato de Sodio para 50 mL de agua bidestilada. Se precalentó un microtubo en baño maría a 37°C y se añadió

100 μ l de solución hipoosmótica, luego se agregó 35 μ l de semen; este microtubo se incubó durante 5 minutos en baño maría y posteriormente se añadió 31 μ l de solución hipoosmótica formolada (1 ml de solución hipoosmótica + 3 μ l de formaldehído 40%) para detener la reacción.

Para la evaluación, se depositó 5 μ l de muestra en una lámina portaobjetos y con una laminilla cubreobjetos; a continuación, se observó la muestra utilizando un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 40X. Los espermatozoides se clasificaron en base a la función osmótica de su membrana: si presentan enrollamiento de la cola de variable intensidad, se consideró con una adecuada función osmótica de la membrana espermática (HOST+); por otro lado, si no muestra ninguna respuesta a la solución hipoosmótica ni enrollamiento de cola, se consideró con una membrana defectuosa (HOST-).

c) Integridad acrosomal

Se evaluó mediante una tinción con Coomassie Blue al 0,22% (Fumuso *et al.*, 2014). Para ello, se utilizó como base agua destilada (20 mL) con Brilliant Blue para Coomassie G250 (0,11 g), metanol (25 mL) y ácido acético al 99% (5 mL). Se utilizaron 10 μ L de muestra para preparar un frotis, el cual se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, los frotis secos se sumergieron en una solución de formaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos para su fijación. Luego, se lavaron los frotis en PBS, realizando cinco inmersiones de un segundo cada una. Los frotis se colocaron en posición vertical para eliminar el exceso de PBS y luego se sumergieron horizontalmente en una solución de Coomassie Blue al 0,22% durante 5 minutos para la tinción. Finalmente, se dejó escurrir el exceso de tinción y se realizaron inmersiones en agua destilada para lavar los frotis (cinco inmersiones de 1 minuto cada una). Después, se dejaron secar al ambiente. Los frotis secos se observaron a 100x con aceite de inmersión en un microscopio de campo claro para clasificar los espermatozoides. Se clasificaron los espermatozoides en base a la coloración del acrosoma: aquellos con coloración azul del acrosoma o estructura acrosomal íntegra se consideraron CB+ (positivos a Coomassie Blue), mientras que aquellos con coloración blanca del acrosoma o acrosoma dañado se consideraron CB-

(negativos a Coomassie Blue). Se cuantificaron no menos de 100 espermatozoides por cada muestra.

III. RESULTADOS

Se ha podido determinar la presencia de antioxidantes en la borra del café de la variedad Bourbon con los ensayos realizados, los mismos se hicieron solo para determinar la presencia de antioxidantes, estos fueron: captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y fenoles totales. De los resultados obtenidos se puede indicar la presencia de antioxidantes como parte del contenido de la borra de café, tal como se detallan en la tabla 1.

Tabla 1.

Valores de los ensayos para determinación de antioxidantes y fenoles totales.

| Ensayos | Media | D.E. | Min | Máx |
|------------------------------------|-------|---------|-------|-------|
| DPPH (mg T Eq/100 mg LBC) | 0.02 | 1,8E-04 | 0.02 | 0.02 |
| FRAP (mg AG/100 mg LBC) | 0.90 | 0.32 | 0.58 | 1.22 |
| Fenoles Totales (mg AG/100 mg LBC) | 13.41 | 0.92 | 12.44 | 14.26 |

DPPH: Captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (mg T Eq/100 mg LBC). FRAP: Poder antioxidante reductor férrico (mg AG/100 mg LBC). DE: Desviación estándar

Previamente a la aplicación de los tratamientos, se evaluaron las características seminales como: volumen, pH, motilidad masal y concentración espermática. Se obtuvo volúmenes entre 3.5 y 9.5 ml, con pH seminal 6.85 ± 0.15 . Asu vez se determinó la motilidad masal de 4, concentración espermática con valores mínimos de $546 \times 10^6/\text{ml}$ y máximos de $1564 \times 10^6/\text{ml}$, se pudo evidenciar que los eyaculados presentaban una coloración blanquecina (Tabla 2).

Tabla 2.

Características seminales de los eyaculados colectados.

| Características | Promedio | D.E | L. máx. | L. min |
|-----------------------------------------|----------|-------|---------|--------|
| Volumen (ml) | 5.85 | 2.16 | 9.5 | 3.5 |
| pH | 6.85 | 0.15 | 6.98 | 6.65 |
| Motilidad masal (MM) | 4 | 0.53 | 5 | 3.5 |
| Concentración espermática (mill spz/ml) | 985.3 | 406.6 | 1564 | 546 |

Una vez tratadas las muestras se evaluaron características microscópicas como:

motilidad total, motilidad progresiva, parámetros cinéticos, funcionalidad de membrana e integridad acrosomal (Anexo 8)

Según los valores obtenidos en factor dosis, se evidenció diferencias significativas ($p < 0,05$) para motilidad total con las 3 dosis de LBC respecto al tratamiento control. Por

otro lado, referente a la motilidad progresiva no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos (tabla 3).

Tabla 3.

Valores promedios de motilidad espermática obtenidos según dosis aplicada.

| DOSIS (mg LBC/ml SD) | MT (%) | MP (%) |
|--------------------------------|----------------|---------------|
| 0 | 97.43 ± 2.24 b | 89.18 ± 8.14 |
| 1 | 98.81 ± 1.66 a | 90.82 ± 7.33 |
| 1.5 | 98.78 ± 1.47 a | 90.49 ± 7.55 |
| 2 | 98.61 ± 1.63 a | 90.20 ± 7.19 |

MT: motilidad total (%); MP: motilidad progresiva (%)

Los resultados son presentados como la media + desviación estándar (DE)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Asimismo, las evaluaciones respecto al factor tiempo (4, 12, 24 y 36 horas) para los parámetros de motilidad total y motilidad progresiva, se evidenció diferencias significativas a las 4 horas de evaluación respecto a los otros tiempo ($p < 0,05$), demostrándose que a una menor cantidad de horas los espermatozoides tienen mejores porcentajes de motilidad, lo cual nos permiten comprobar de manera estadística la viabilidad de los espermatozoides con relación a su fisiología biológica, tal como se detalla en la tabla 4.

Tabla 4.

Valores de motilidad espermática obtenidos respecto al tiempo de evaluación.

| Tiempo (horas) | MT (%) | MP (%) |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 4 | 99.11 ± 1.22 a | 93.13 ± 6.76 a |
| 12 | 98.52 ± 1.68 ab | 91.78 ± 6.43 ab |
| 24 | 98.21 ± 1.79 b | 89.20 ± 6.17 bc |
| 36 | 97.78 ± 2.33 b | 86.58 ± 8.90 c |

MT: motilidad total (%); MP: motilidad progresiva (%)

Los resultados son presentados como la media + desviación estándar (DE)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De igual manera, se evaluó la interacción de los factores dosis x tiempo respecto a los parámetros de motilidad total y progresiva, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) en la interacción de dosis y tiempos, siendo la dosis de 1mg LBC/ml SD a las 4 horas para motilidad total. A demás de ello, se evidenció que la dosis de 1 mg LBC/ml SD a las 12 horas presentaba efectos benéficos para motilidad progresiva con los mejores porcentajes, tal como se puede observar en la tabla 5.

Tabla 5.

Valores promedios de interacción de factores dosis x tiempo respecto a motilidad espermática.

| Dosis (mg LBC/ml) | Tiempo (horas) | MT (%) | MP (%) |
|----------------------|-------------------|------------------|------------------|
| 0 | 4 | 98.27 ± 1.90 a-d | 91.05 ± 7.87 ab |
| 1 | | 99.71 ± 0.27 a | 93.89 ± 7.48 a |
| 1.5 | | 99.38 ± 0.77 ab | 93.89 ± 6.97 a |
| 2 | | 99.09 ± 0.99 ab | 93.70 ± 5.03 a |
| 0 | 12 | 97.55 ± 2.06 b-d | 90.57 ± 9.20 ab |
| 1 | | 99.03 ± 1.14 ab | 93.83 ± 5.21 a |
| 1.5 | | 98.71 ± 2.00 a-c | 91.65 ± 4.08 ab |
| 2 | | 98.80 ± 1.08 a-c | 91.08 ± 6.64 ab |
| 0 | 24 | 97.17 ± 2.35 cd | 89.10 ± 5.97 ab |
| 1 | | 98.48 ± 1.38 a-d | 88.22 ± 6.74 ab |
| 1.5 | | 98.66 ± 1.07 a-c | 89.83 ± 6.20 ab |
| 2 | | 98.54 ± 1.91 a-c | 89.63 ± 6.63 ab |
| 0 | 36 | 96.72 ± 2.64 d | 86.00 ± 9.38 b |
| 1 | | 98.01 ± 2.62 a-d | 87.36 ± 7.92 ab |
| 1.5 | | 98.38 ± 1.74 a-d | 86.58 ± 10.58 ab |
| 2 | | 98.01 ± 2.23 a-d | 86.38 ± 8.91 ab |

LBC: Liofilizado de la borra de café. MT: motilidad total (%); MP: motilidad progresiva (%)

Los resultados son presentados como la media + desviación estándar (DE)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Por otro lado, también se determinaron valores respecto a parámetros cinéticos: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), Velocidad lineal (VSL), Índice de rectitud (STR), Índice de linealidad (LIN), Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH) y Frecuencia de batido de cola (BFH), evidenciándose resultados estadísticamente no significativos ($p > 0,05$) respecto a las dosis evaluadas, tal como se detalla en la tabla 6.

Tabla 6.

Valores promedios de parámetros cinéticos respecto a dosis.

| Parámetros cinéticos | DOSIS (mg LBC/ml SD) | | | |
|-------------------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0 | 1 | 1.5 | 2 |
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 171.15 ± 36.49 | 171.74 ± 39.28 | 166.90 ± 40.73 | 168.37 ± 40.50 |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 93.42 ± 17.01 | 95.57 ± 18.74 | 94.18 ± 18.52 | 93.82 ± 19.29 |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 74.34 ± 13.00 | 76.46 ± 14.68 | 75.31 ± 13.96 | 74.88 ± 14.65 |
| STR (%) | 79.76 ± 2.53 | 79.96 ± 2.49 | 80.13 ± 2.93 | 80.11 ± 2.71 |
| LIN (%) | 47.62 ± 6.48 | 46.83 ± 5.47 | 46.18 ± 4.63 | 45.23 ± 3.76 |
| ALH ($\mu\text{m/s}$) | 4.42 ± 1.29 | 4.26 ± 0.96 | 4.17 ± 0.98 | 4.14 ± 0.98 |
| BCF (Hz) | 12.08 ± 2.18 | 12.38 ± 2.22 | 12.34 ± 1.94 | 12.61 ± 2.62 |

LBC: Liofilizado de la borra de café. VCL: Velocidad curvilínea(m/s); VAP: Velocidad medio (um/s); VSL: velocidad lineal (um/s); STR: índice de rectitud (%); LIN: índice de linealidad (%); ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (µm/s); BCF: Frecuencia del batido de cola (Hz)
Los resultados son presentados como la media + desviación estándar (DE)

Asu vez, respecto a los parámetros cinéticos descritos anteriormente, con relación al factor tiempo se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) para VCL, VAP, VSL, STR, ALH y BCF, teniendo mejores promedios a las 4 horas respecto a los otros tiempos evaluados, a continuación, se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7.

Valores promedios de parámetros cinéticos respecto al tiempo de evaluación.

| Parámetros cinéticos | Tiempo (horas) | | | |
|----------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | 4 | 12 | 24 | 36 |
| VCL (µm/s) | 183.41 ± 33.20 a | 170.83 ± 42.25 ab | 166.53 ± 34.88 ab | 157.39 ± 41.55 b |
| VAP (µm/s) | 101.77 ± 16.17 a | 95.04 ± 18.93 ab | 91.99 ± 16.36 b | 88.19 ± 19.21 b |
| VSL (µm/s) | 82.16 ± 12.50 a | 76.01 ± 14.22 b | 72.90 ± 13.72 b | 69.92 ± 12.87 b |
| STR (%) | 80.74 ± 2.44 a | 80.15 ± 2.92 ab | 79.65 ± 2.45 ab | 79.43 ± 2.66 b |
| LIN (%) | 47.62 ± 6.48 | 46.83 ± 5.47 | 46.18 ± 4.63 | 45.23 ± 3.76 |
| ALH (µm/s) | 4.62 ± 1.21 a | 4.29 ± 1.11 ab | 4.13 ± 0.86 ab | 3.95 ± 0.94 b |
| BCF (Hz) | 14.07 ± 2.60 a | 12.29 ± 2.40 b | 11.75 ± 1.59 bc | 11.29 ± 0.90 c |

VCL: Velocidad curvilínea(m/s); VAP: Velocidad media (um/s); VSL: velocidad lineal (um/s); STR: índice de rectitud (%); LIN: índice de linealidad (%); ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (µm/s); BCF: Frecuencia del batido de cola (Hz)

Los resultados son presentados como la media + desviación estándar (DE)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Respecto a la interacción de factores (dosis x tiempo) para la evaluación de los parámetros cinéticos, se evidenció diferencias significativas para VAP, VSL y BCF, obteniendo los mejores valores a las 4 horas de evaluación con 1.5 mg de LBC/ml SD, tal como se detalla a continuación en la tabla 8.

Tabla 8.

Valores promedios respecto a los parámetros cinéticos evaluados.

| DOSIS (mg LBC/ml SD) | TIEMPO (horas) | VCL ($\mu\text{m/s}$) | VAP ($\mu\text{m/s}$) | VSL ($\mu\text{m/s}$) | STR (%) | LIN (%) | ALH ($\mu\text{m/s}$) | BCF (Hz) |
|----------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|------------------|-------------------------|----------------------|
| 0 | 4 | 179.84 \pm 33.69 | 99.75 \pm 14.63 ab | 80.36 \pm 11.35 abc | 80.47 \pm 2.81 | 46.68 \pm 5.24 | 5.01 \pm 1.90 | 13.75 \pm 2.57 ab |
| 1 | | 189.40 \pm 32.16 | 104.88 \pm 18.61 a | 84.97 \pm 14.88 a | 80.97 \pm 2.37 | 47.62 \pm 7.26 | 4.61 \pm 0.80 | 14.17 \pm 2.83 a |
| 1.5 | | 181.94 \pm 32.62 | 101.45 \pm 15.49 ab | 81.97 \pm 11.80 ab | 80.81 \pm 2.46 | 48.50 \pm 8.92 | 4.42 \pm 0.84 | 13.99 \pm 2.38 a |
| 2 | | 182.44 \pm 38.56 | 101.01 \pm 17.79 ab | 81.34 \pm 13.21 ab | 80.69 \pm 2.47 | 47.70 \pm 4.51 | 4.44 \pm 1.04 | 14.36 \pm 2.97 a |
| 0 | 12 | 175.95 \pm 33.96 | 96.00 \pm 17.06 ab | 76.02 \pm 12.79 abc | 79.79 \pm 2.96 | 46.51 \pm 6.08 | 4.44 \pm 0.99 | 11.82 \pm 2.56 bc |
| 1 | | 173.10 \pm 50.68 | 96.29 \pm 21.85 ab | 77.48 \pm 16.64 abc | 80.13 \pm 2.96 | 46.52 \pm 3.83 | 4.21 \pm 1.19 | 12.42 \pm 2.12 abc |
| 1.5 | | 163.01 \pm 38.48 | 92.80 \pm 17.26 ab | 74.35 \pm 12.30 abc | 80.38 \pm 3.63 | 47.29 \pm 7.21 | 4.28 \pm 1.18 | 11.98 \pm 1.35 bc |
| 2 | | 171.27 \pm 49.28 | 95.06 \pm 21.86 ab | 76.18 \pm 16.69 abc | 80.30 \pm 2.44 | 46.98 \pm 5.04 | 4.21 \pm 1.21 | 12.94 \pm 3.35 abc |
| 0 | 24 | 175.80 \pm 31.03 | 93.56 \pm 15.36 ab | 74.11 \pm 11.44 abc | 79.45 \pm 2.02 | 44.75 \pm 2.66 | 4.40 \pm 0.79 | 11.49 \pm 1.53 c |
| 1 | | 165.42 \pm 36.13 | 92.94 \pm 16.08 ab | 73.67 \pm 12.22 abc | 79.36 \pm 2.05 | 46.37 \pm 5.13 | 4.11 \pm 0.89 | 11.83 \pm 1.46 bc |
| 1.5 | | 163.12 \pm 40.25 | 91.59 \pm 17.16 ab | 72.52 \pm 18.59 abc | 79.78 \pm 2.22 | 46.90 \pm 4.72 | 3.99 \pm 1.00 | 11.87 \pm 1.90 bc |
| 2 | | 161.79 \pm 35.34 | 89.87 \pm 19.02 ab | 71.30 \pm 13.58 abc | 80.02 \pm 3.54 | 46.68 \pm 5.83 | 4.03 \pm 0.80 | 11.82 \pm 1.67 bc |
| 0 | 36 | 153.01 \pm 44.93 | 84.38 \pm 19.22 b | 66.86 \pm 14.26 c | 79.35 \pm 2.45 | 44.09 \pm 4.12 | 3.84 \pm 1.10 | 11.27 \pm 0.81 c |
| 1 | | 159.06 \pm 34.73 | 88.15 \pm 16.54 ab | 69.72 \pm 12.05 bc | 79.39 \pm 2.53 | 46.01 \pm 3.69 | 4.10 \pm 0.95 | 11.11 \pm 0.99 c |
| 1.5 | | 159.52 \pm 51.77 | 90.87 \pm 23.95 ab | 72.40 \pm 11.82 abc | 79.57 \pm 3.47 | 45.23 \pm 4.58 | 3.99 \pm 0.94 | 11.50 \pm 0.99 c |
| 2 | | 157.96 \pm 39.32 | 89.35 \pm 18.91 ab | 70.72 \pm 14.54 abc | 79.43 \pm 2.50 | 45.59 \pm 2.73 | 3.89 \pm 0.90 | 11.31 \pm 0.91 c |

LBC: Liofilizado de la borra de café. VCL: Velocidad curvilínea(m/s); VAP: Velocidad medio ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad lineal ($\mu\text{m/s}$); STR: índice de rectitud (%); LIN: índice de linealidad (%); ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ($\mu\text{m/s}$); BCF: Frecuencia del batido de cola (Hz)
 Los resultados son presentados como la media + desviación estándar (DE) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Funcionalidad de la membrana

Mediante el grafico de barras se presenta la descripción de los valores obtenidos, en el cual se muestra que la mejor interacción de la evaluación se presentó para la dosis de 1 mg LBC/ml en el tiempo de 4 horas, registrando el porcentaje más alto respecto a la funcionalidad de membrana, tal como se detalla a continuación en la figura 2.

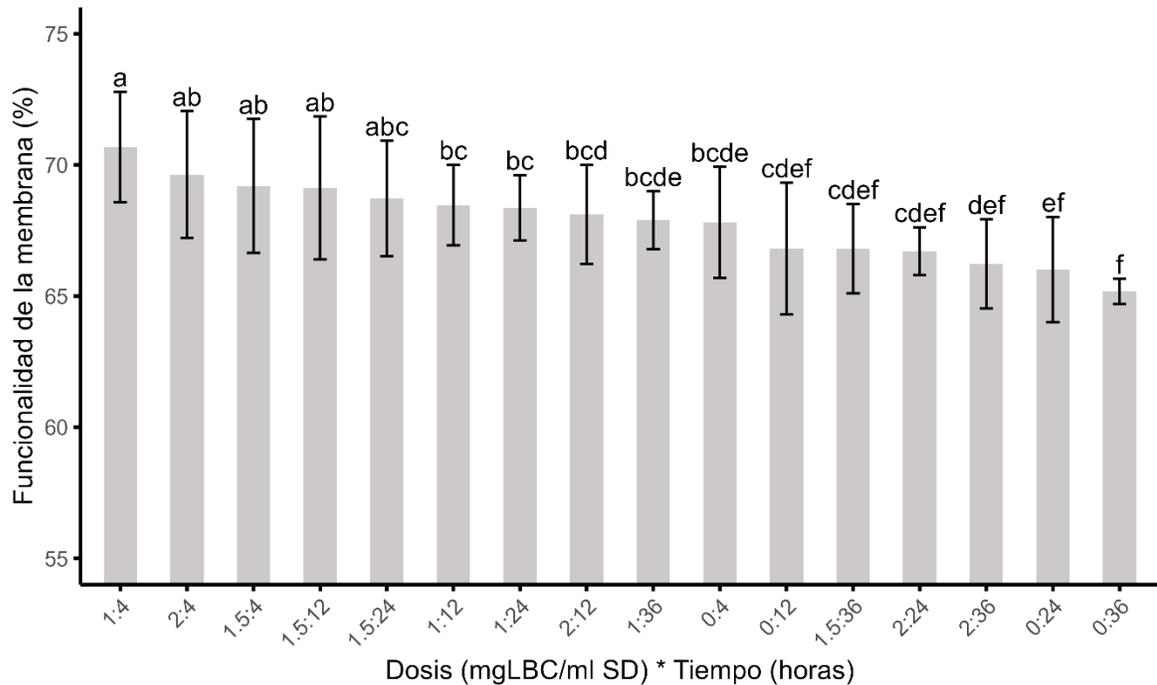


Figura 2.

Valores promedios de la interacción de la dosis x tiempo respecto a la funcionalidad de membrana.

Integridad acrosomal

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en integridad acrosomal según la interacción de los factores dosis x tiempo con mejores promedios al adicionar 1 mg LBC/ml SD a las 4 horas de evaluación, tal como se detalla en la figura 3.

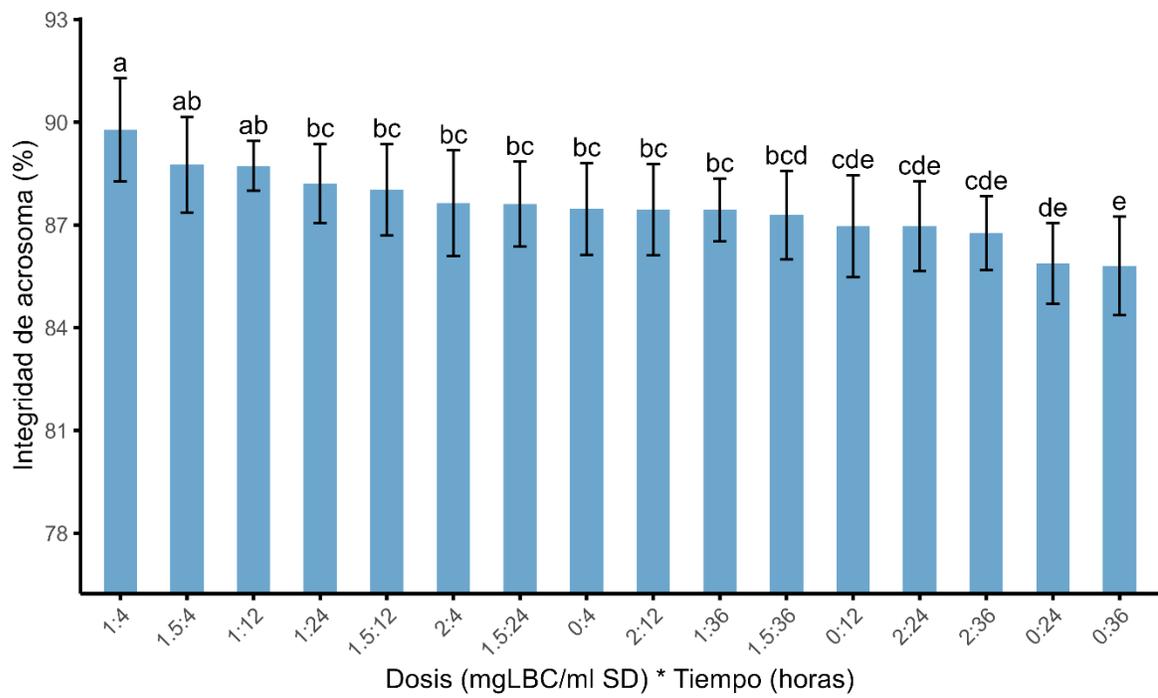


Figura 3.

Valores promedios de la interacción de la dosis x tiempo respecto a la integridad acrosomal.

IV. DISCUSIÓN

El uso de antioxidantes podría mitigar el impacto negativo de los ROS en los espermatozoides (Kaltsas, 2023). En esta investigación se analizó la capacidad antioxidante y el efecto de diversas dosis de LBC en parámetros seminales a diferentes tiempos post refrigeración. La incorporación de antioxidantes en los diluyentes brinda un efecto protector que mejora la calidad espermática en toros, carneros, cabras, cerdos, perros y humanos (Zhang *et al.*, 2022; Shakouri, *et al.*, 2021). Esto se apoya en la capacidad antioxidante de la borra de café determinada mediante los ensayos DPPH, FRAP y Fenoles totales de LBC (Andrade *et al.*, 2022) y su efecto en ciertos parámetros seminales (Rojas & Cardona, 2020).

En el estudio de Vélez-Castañeda, *et al.*, 2014 reportaron en promedio de $6,90 \pm 0,42$ ml, con una concentración espermática de $715,00 \pm 413,37 \times 10^6$ spz/ml; a diferencia de los valores obtenidos en la presente investigación con volumen seminal promedio de 5.85 ± 2.16 ml con variaciones entre 3.5 y 9.5ml con concentración espermática $985.3 \pm 406.6 \times 10^6$ spz/ml. Sin embargo, se establecen coincidencia respecto al color y valor de pH presente en las muestras seminales obtenidas.

La incorporación de antioxidantes naturales en el medio de dilución mejora la conservación de la motilidad del esperma de toros de bali, al añadir 0.05 mg/100 ml de extracto de té verde al dilutor antes de la criopreservación (Prastiya *et al.*, 2023), y al incluir extracto de hinojo en el esperma porcino con la adición de 10 g según Malo *et al.*, (2012). Asimismo, Abdramanov *et al.* (2017) reportan que la adición de 10 µg/ml de extracto de saúco (*Sambucus nigra*) con propiedades antioxidantes mejora la motilidad espermática en toros Holstein al evaluar post refrigeración; resultados que coinciden con nuestra investigación en la mejora de la motilidad espermática al adicionar 1 mg/ml de LBC en semen bovino.

En el estudio realizado por Araya-Zuñiga, *et al.*, 2023 se evaluaron parámetros cinéticos con el dilutor Optixcell® mediante el sistema CASA-Mot, teniendo como resultado respecto a : VCL: velocidad curvilínea (µm/s) de 179.27 ± 0.37 ; VSL: velocidad rectilínea (µm/s) de 86.60 ± 0.24 ; VAP: velocidad promedio de la trayectoria (µm/s) de: 106.67 ± 0.24 ; LIN: linealidad de la progresión (%) de 50.34 ± 0.10 ; STR: índice de rectitud (%) de 79.35 ± 0.10 ; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (µm) de 3.77 ± 0.01 ; BCF: frecuencia de entrecruzamiento (Hz) de 17.17 ± 0.04 . Estos valores varían respecto a los resultados

obtenidos con la aplicación del dilutor en muestras seminales con borra de café en dosis que varían desde 0 mg LBC/ml hasta 2 mg LBC/ml mediante el sistema computarizado de análisis seminal CASA SCA® (Sperm Class Analyzer - SCA®) obteniéndose resultados en rangos de 189.40 ± 32.16 a 153.01 ± 44.93 para la VCL con 1 mg LBC/ ml SD a las 4 horas de evaluación y el control a las 36 horas de evaluación respectivamente; 104.88 ± 18.61 a 84.38 ± 19.22 para VAP con un 1 mg LBC/ml SD a las 4 horas de evaluación y el control a las 36 horas respectivamente; 84.97 ± 14.88 a 66.86 ± 14.26 para la VSL con la adición de un 1 mg LBC/ml SD a las 4 horas de evaluación y el control a las 36 horas respectivamente; 80.97 ± 2.37 a 79.35 ± 2.45 para la STR; 48.50 ± 8.89 a 44.09 ± 4.12 para LIN; 59.78 ± 8.10 a 55.25 ± 4.99 para la ALH y 14.36 ± 2.97 a 11.11 ± 0.99 para BCF con la adición de 1 mg LBC/ml SD a las 4 horas y 1.5 mg LBC/ml SD a las 36 horas de evaluación respectivamente; estos datos obtenidos no presentan diferencia significancia respecto al factor dosis, pero los datos son muy similares a los reportados por Araña-Zuñiga con relación al uso del dilutor comercial.

Asimismo, se debe de mencionar que respecto a la interacción de los factores dosis y tiempo respecto a las evaluaciones realizadas solamente se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los parámetros VAP, VSL y BCF: destacando la dosis de 1 mg LBC/ ml SD a las 4 horas de evaluación en los tres parámetros, VAP y VSL tienen gran importancia debido a que están directamente relacionadas con la capacidad fecundante de los espermatozoides (Aghazarian *et al.*, 2021). Cabe mencionar que respecto a BCF los datos obtenidos en esta investigación son muy similares a los obtenidos por Arbaiza-Barnechea & Cabrera-Villanueva (2021), los cuales reportaron 15.92 ± 1.58 ; así mismo que este parámetro tiene influencia en la migración y penetración en el moco cervical por parte de los espermatozoides (Ormachea *et al.*, 2019).

En la evaluación de la funcionalidad de la membrana se observó rangos entre 70.68 ± 2.10 y 65.18 ± 0.48 para la dosis de 1 mg LBC/ ml SD a las 4 horas y el control a las 36 horas de evaluación respectivamente, datos similares fueron reportados por Bahmid *et al.* (2023), quien reportó un promedio de 63.49 ± 1.46 en semen refrigerado; se observa el beneficio de la adición de LBC para funcionalidad de membrana de los espermatozoides que podría estar

relacionado por la disminución del estrés oxidativo (Catalán, *et al.*, 2024; Abdramanov, *et al.*, 2017).

El acrosoma del espermatozoide, es fundamental para la fertilización, debido a su contenido de enzimas que facilitan la penetración del espermatozoide en el óvulo, así mismo la integridad acrosómica intacta y la capacidad de experimentar la reacción acrosómica son cruciales para la fertilidad de los espermatozoides (Xu *et al.*, 2018), corroborado con análisis moleculares de Talluri *et al.*, (2022) que encontraron que los genes en toros de baja fertilidad tenían una correlación negativa con la integridad acrosomal. Teniendo en cuenta de la importancia del acrosoma, en nuestro estudio se encontró que la adición de 1mg/ml de LBC mejora significativamente la integridad acrosomal a las 4 horas, mostrando el beneficio de los antioxidantes, del mismo modo se observó mejoras en todas las horas post refrigeración comparadas con el grupo control, mismos beneficios reportados por Rahman *et al.*, (2019) quienes adicionaron bisfenol A un disruptor endocrino causante de ROS a muestras seminales de ratón para ver el efecto de antioxidantes (vitamina C y E) sobre los efectos negativos del bisfenol A sobre la integridad acrosomal, concluyendo que la adición de estos antioxidantes previenen la disminución de integridad y reacción acrosomal de los espermatozoides. Por lo contrario, Losano *et al.*, (2018) reportan que la adición de antioxidantes (glutación peroxidasa y superóxido dismutasa) con ácido docosahexaenoico (DHA) en muestras seminales disminuye mínimamente la integridad acrosomal que podría ser explicado por que sus muestras fueron extraídas de epidídimo de toros post mortem de matadero.

V. CONCLUSIONES

- Se determinó la actividad antioxidante y el contenido fenólico de la borra de café mediante los ensayos captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y fenoles totales.
- La adición de del liofilizado de borra de café al semen mejoró la motilidad total (1, 1.5 y 2 mg LBC/ml semen), funcionalidad de membrana (1 mg LBC/ml semen) e integridad de acrosoma (1 mg LBC/ml semen) de los espermatozoides. Los mejores resultados se observaron a las 4 horas de evaluación post colecta seminal, lo cual indicaría ser el tiempo óptimo para criopreservar y evitar la disminución de parámetros seminales en consideración a la fisiología biológica de los espermatozoides.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdramanov, A., Massanyi, P., Sarsembayeva, N., Usenbayev, A., Alimov, J., & Tvrđić, E. (2017). The in vitro effect of elderberry (*sambucus nigra*) extract on the activity and oxidative profile of bovine spermatozoa. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(6), 1319–1322. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.6.1319-1322>
- Aghazarian, A., Huf, W., Pflüger, H., & Klatte, T. (2021). Standard Semen Parameters vs. Sperm Kinematics to Predict Sperm DNA Damage. *The world journal of men's health*, 39(1), 116–122. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190095>
- Andrade, C., Perestrelo, R., & Câmara, J. S. (2022). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity from Spent Coffee Grounds as a Powerful Approach for Its Valorization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(21), 7504. <https://doi.org/10.3390/molecules27217504>
- Araya-Zúñiga, I., Sevilla, F., Barquero, V., & Valverde, A. (2023). El efecto del extensor, la edad y el estado sexual bovino sobre la cinemática del espermatozoa. *Agronomía Mesoamericana*, 34 (3), 52597. <https://doi.org/10.15517/am.2023.52597>
- Arbaiza-Barnechea, M. D., y Cabrera-Villanueva, P. C. (2021). Efecto de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN, viabilidad, y parámetros cinéticos en toros Brown Swiss. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 13(1), e787. <https://doi.org/10.24188/recia.v13.n1.2021.787>
- Bahmid, N.A., Jamil, N.I., Yusuf, O.D.P., Farida, S., Gustina, S. (2023). Plasma membrane integrity and acrosomal integrity of fresh and frozen Bali bull semen based on different ejaculate volume. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 1174(1), 012-034. 012034. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1174/1/012034>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Catalán, J., Yáñez-Ortiz, I., Torres-Garrido, M., Ribas-Maynou, J., Llavanera, M., Barranco, I., Yeste, M., & Miró, J. (2024). Impact of Seminal Plasma Antioxidants on DNA

- Fragmentation and Lipid Peroxidation of Frozen-Thawed Horse Sperm. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 13(3), 322. <https://doi.org/10.3390/antiox13030322>
- Çelik, E. E., & Gökmen, V. (2018). A study on interactions between the insoluble fractions of different coffee infusions and major cocoa free antioxidants and different coffee infusions and dark chocolate. *Food chemistry*, 255, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.048>
- Cortes, S., Ortiz, A., & Ramirez, L. (2017). Determinación de antioxidante en subproductos de café producido y comercializado en Risaralda (Colombia). *Revista de la Universidad Tecnológica de Pereira*, 1–8. [content \(utp.edu.co\)](http://content.utp.edu.co)
- Erskine, E., Gültekin Subaşı, B., Vahapoglu, B., & Capanoglu, E. (2022). Coffee Phenolics and Their Interaction with Other Food Phenolics: Antagonistic and Synergistic Effects. *ACS Omega*, 7(2), 1595–1601. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06085>
- Fernández-Cortés, Y., Sotto-Rodríguez, K. D., & Vargas-Marín, L. A. (2020). Impactos ambientales de la producción del café, y el aprovechamiento sustentable de los residuos generados. *Producción+ limpia* [online], 15(1), 93-110. <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v15n1/1909-0455-pml-15-01-93.pdf>
- Franca, A & Oliveira, L. (2019). Chapter 17 - Coffee en Pan, Z.; Zhang, Ruihong & Zicari, S. (Ed.), *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products* (pp. 413-438). Editorial Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814138-0.00017-4>
- Fumoso, F., Gimenez, M., Neild, D., Giuliano, S., Chaves, M., Carretero, M. (2014). Comparison of washing methods and smear conservation periods for llama sperm acrosome assessment using the Coomassie Blue stain. *Spermova*, 4(1), 50–53. <http://hdl.handle.net/11336/18690>
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility*, 70(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>

- Kaltsas, Aris. 2023. "Oxidative Stress and Male Infertility: The Protective Role of Antioxidants" *Medicina* 59, no. 10: 1769. <https://doi.org/10.3390/medicina59101769>
- Losano, J. D. A., Angrimani, D. S. R., Rui, B. R., Bicudo, L. C., Dalmazzo, A., Silva, B. C. S., Viana, C. H. C., Mendes, C. M., Assumpção, M. E. O. A., Barnabe, V. H., & Nichi, M. (2018). The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. *Zygote*, 26(3), 199-206. <https://doi.org/10.1017/S0967199418000096>
- Malo, C., Gil, L., Cano, R., González, N., & Luño, V. (2012). Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. *Andrologia*, 44 Suppl 1, 710–715. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01254.x>
- Mata, J. A. (2022). Aprovechamiento de la pulpa de café como medio para producir biogás. *Education, Research and Leadership in Post-pandemic Engineering: Resilient, Inclusive and Sustainable Actions*, 1–8. <https://doi.org/10.18687/LACCEI2022.1.1.708>
- Midagri. (2023). Perfil productivo regional. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiYjYwYTtk5MDgtM2M0MS00NDMyLTgzNDk0Yjg2ZmQzNWYzZiJ9>
- Millones, K. & Moran, A. (2019) *Incorporación de las Nuevas Tecnologías del Proceso Productivo para la Mejora de la Productividad Lechera y Rentabilidad del Establo “Agroindustria Ganadera Don Rómulo EIRL” en la Provincia de Arequipa 2013-2017* [Tesis de Pregrado]. Repositorio institucional de la Universidad Católica Santa María <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/00ce08fb-6575-45d2-80cd-cd194ffa1e31>
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036>
- Myo, H., & Khat-Udomkiri, N. (2022). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from coffee pulp using propylene glycol as a solvent and their

- antioxidant activities. *Ultrasonics Sonochemistry*, 89, 106127. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106127>
- Ormachea, V.E., Calsin, C.B., Zegarra, O.E. (2019). Cinética y morfometría espermática en semen congelado sexado y convencional de toros Brown Swiss. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(1),500-506. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14696>
- Prastiya, R. A., Debora, A. E., Wijayanti, A., Agustono, B., Saputro, A. L., Amalia, A., & Sasi, S. M. (2023). Sperm Kinematics and Morphology of Bali Bull (*Bos javanicus*) after Freezing and Thawing Treated with Green Tea Extract in Extender. *Tropical Animal Science Journal*, 46(4), Article 4. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.4.418>
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Rahman, M. S., Kang, K.-H., Arifuzzaman, S., Pang, W.-K., Ryu, D.-Y., Song, W.-H., Park, Y.-J., & Pang, M.-G. (2019). Effect of antioxidants on BPA-induced stress on sperm function in a mouse model. *Scientific Reports*, 9(1), 10584. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47158-9>
- Rojas, B., & Cardona, W. (2020). Efecto de la borra de café sobre la biológica espermática: aproximación in vitro. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 85(4), 312-323. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262020000400312>
- Rosete, J., Álvarez, H., Urbán, D., Fragoso, A., Asprón, M., Ríos, A., Pérez, S., & Torre, J. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(3), 39-78. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food chemistry*, 121(4), 996-1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>

- Sánchez, W. (2023). Ganadería Lechera en el Moshav Nahalal de Israel y su Propuesta de Implementación en el Contexto de la Costa Peruana [Tesis de Maestría]. Repositorio Institucional Universidad Nacional Agraria La Molina <https://hdl.handle.net/20.500.12996/5725>
- Segura, G. T., Quispe-Ccasa, H. A., Saucedo-Uriarte, J. A., Poclín Rojas, A. Y., Murga, N. L., Cortez, J. V., & Ampuero, G. (2023). Efecto de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen en ganado cebuino del Trópico Peruano. *Revista Veterinaria*, 34(1), 33–39. <https://doi.org/10.30972/vet.3416608>
- Shakouri, N., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A., & Bucak, M. N. (2021). Antioxidant effects of supplementation of 3,4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 56(7), 1004–1014. <https://doi.org/10.1111/rda.13944>
- Singh, B., Singh, K. P., Hoque, M., & Mondal, S. (2022). Chapter Fifteen—Biotechnology in livestock reproduction. En S. Mondal & R. L. Singh (Eds.), *Emerging Issues in Climate Smart Livestock Production* (pp. 371-413). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822265-2.00013-2>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Suanes, A., Macchi, V., Fernández, F., Salaberry, X., & Moreira, C. (2021). Características reproductivas, sanitarias y de manejo en establecimientos lecheros del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 57(215). <https://doi.org/10.29155/vet.57.215.3>
- Talluri, T. R., Kumaresan, A., Sinha, M. K., Paul, N., Ebenezer Samuel King, J. P., & Datta, T. K. (2022). Integrated multi-omics analyses reveals molecules governing sperm metabolism potentially influence bull fertility. *Scientific Reports*, 12(1), 10692. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14589-w>

- Vallet-Buisan, M., Mecca, R., Jones, C., Coward, K., & Yeste, M. (2023). Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond. *Human reproduction update*, 29(4), 395–433. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad006>
- Valverde, A. (2021). Importancia de la evaluación de la aptitud reproductiva mediante el análisis de semen por sistemas CASA. *Investiga. TEC*, 1(40). https://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/view/5616
- Vélez-Castañeda, L., Rugeles-Pinto, C., y Vergara-Garay, O. (2014). Efecto de la raza sobre las características reproductivas de toros manejados en sistemas extensivos. *Revista Científica*, XXIV (4), 341-346. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95931404002.pdf>
- Xu, F., Guo, G., Zhu, W., & Fan, L. (2018). Human sperm acrosome function assays are predictive of fertilization rate in vitro: A retrospective cohort study and meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 16, 81. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0398-y>
- Yoplac, I., Yalta, J., Vásquez, V., & Maicelo, J. (2017). Efecto de la alimentación con pulpa de café (*Coffea arabica*) en los índices productivos de cuyes (*Cavia porcellus* L) Raza Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(3), 549-560. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13362>
- Zhang, W., Min, L., Li, Y., Lang, Y., Hoque, S. A. M., Adetunji, A. O., & Zhu, Z. (2022). Beneficial Effect of Proline Supplementation on Goat Spermatozoa Quality during Cryopreservation. *Animals*, 12(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ani12192626>

ANEXOS

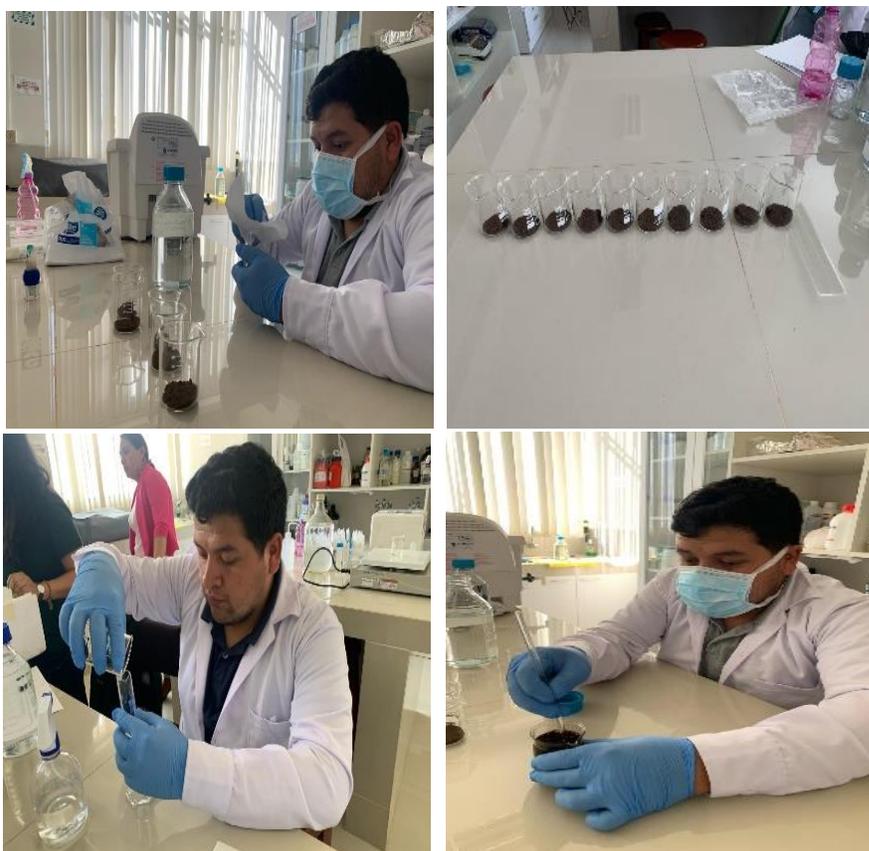
Anexo 1.

Obtención, secado y almacenamiento de borra de café



Anexo 2.

Preparación de los extractos de borra de café



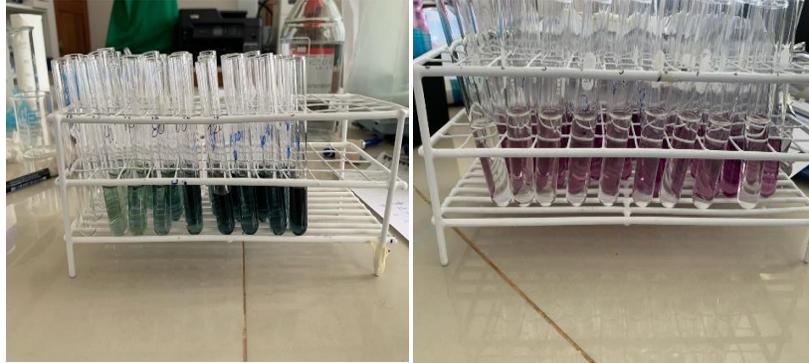
Anexo 3.

Extracción de antioxidantes por sonicador, centrifugado y filtrado de los extractos de borra de café



Anexo 4.

Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido fenólico de borra de café.



Anexo 5.

Colecta seminal por método de vagina artificial.



Anexo 6.

Evaluaciones de parámetros seminales (pH, concentración, motilidad y parámetros cinéticos)



Anexo 7.

Evaluación de integridad de acrosoma y funcionalidad de membrana de



Anexo 8.

Definiciones cinemáticas y morfológicas de esperma y definiciones.

| Variables | Unidad | Definiciones |
|-----------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Descripción cinemática de espermatozoides | | |
| Motilidad total (MT) | % | Porcentaje total de espermatozoides móviles |
| Motilidad progresiva (MP) | % | Porcentaje total de espermatozoides progresivos |
| Velocidad curvilínea (VCL) | $\mu\text{m/s}$ | Velocidad de trayectoria del espermatozoide a lo largo de su dirección real por unidad de tiempo |
| Velocidad media (VAP) | $\mu\text{m/s}$ | Velocidad media del espermatozoide a lo largo de su trayectoria |
| Velocidad lineal (VSL) | $\mu\text{m/s}$ | Velocidad media de la trayectoria del espermatozoide en línea recta desde su primera hasta su última posición |
| índice de rectitud (STR) | % | Rectitud del movimiento de los espermatozoides |
| índice de linealidad (LIN) | % | Linealidad del movimiento de los espermatozoides |
| Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH) | $\mu\text{m/s}$ | Desviación estandar del movimiento lateral extremo de la cabeza del espermatozoide durante cada ciclo de latido |
| Frecuencia del batido de cola (BCF) | Hz | Frecuencia de cruce de batidos de cola basada en VCL cruzando VAP por segundo |
| Integridad de espermatozoide | | |
| Funcionalidad de membrana (FM) | % | Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegro |
| Integridad de acrosoma (IA) | % | Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro |