

**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**

**POTENCIAL BIOACTIVO DE PULPA DE CAFÉ PARA
MANTENER LA CALIDAD DE SEMEN
CRIOPRESERVADO DE GANADO BOVINO**

Autor: Bach. Edson Omar Castro Rios

Asesor: Ms. Marilu Mestanza Mendoza

Asesor: M. Sc. Gleni Tatiana Segura Portocarrero

Registro (...)

Chachapoyas – Perú

2024

DEDICATORIA

A mi madre y a mi padre quienes con esfuerzo, sacrificio y amor han contribuido para alcanzar cada una de mis metas. Ellos que con sus consejos y palabras de aliento me dieron la fuerza y motivación para salir adelante en los momentos más difíciles.

A mi familiares (Tíos, Primos) quienes me brindaron su apoyo en los momentos más complicados y por siempre estar presente en cada momento.

AGRADECIMIENTO

Primero quiero agradecer a Dios por darme vida y salud para seguir cumpliendo cada una de mis metas que me proponga, por guiarme por el camino del bien a lo largo de mi existencia, por ser mi fortaleza espiritual en los momentos de dificultad y debilidad.

Asimismo, agradezco a mis padres Oscar Hugo Castro Delgado y Fabriciana Isabel Ríos Escobedo por siempre darme el apoyo que necesito, por el cariño y por los consejos que siempre me dan, por ser el motor que me impulsa a seguir adelante día a día.

Agradezco a mi asesor (a) Marilu Mestanza Mendoza y Gleni Tatiana Segura Portocarrero y a todas las personas que me ayudaron de una u otra manera en el desarrollo de mi tesis.

**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 LUJAN ESPINOZA

Vicerrector 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 ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Potencial bioactiva de pulpa de café para mantener la calidad de semen criopreservado de ganado bovino; del egresado Edson Omar Castro Ríos de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agropecuarias 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. Nailu Nestanza Mendoza





ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

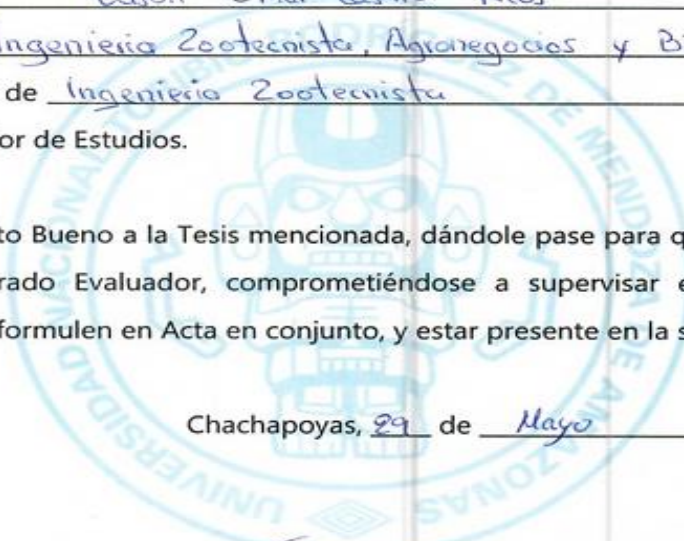
El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Potencial bioactivo de pulpa de café para mantener la calidad de semen expreservado de ganado bovino; del egresado Edson Omar Castro Rios de la Facultad de Ingeniería 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. Glauco Tatiana Segura Portocarrero



JURADO EVALUADOR DE TESIS



M. Sc. Luis Homero Zagaceta Llanca

PRESIDENTE



Dr. Hugo Frías Torres

SECRETARIO



M. Sc. Cesar Augusto Maravi Carmen

VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TESIS



UNTRM

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

ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

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

Potencial bioactivo de pulpa de café para mantener la
calidad de semen criopreservado de ganado bovino

presentada por el estudiante ()/egresado (x) Edson Omar Castro Rios

de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista

con correo electrónico institucional 7109502581@untrm.edu.pe

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

- La citada Tesis tiene 23 % 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.
- 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, 19 de junio del 2024


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

REPORTE DE TURNITIN

POTENCIAL BIOACTIVO DE PULPA DE CAFÉ PARA MANTENER LA CALIDAD DE SEMEN CRIOPRESERVADO DE GANADO BOVINO

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%	22%	7%	4%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.untrm.edu.pe Fuente de Internet	6%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	www.scielo.org.ar Fuente de Internet	2%
4	revistas.unne.edu.ar Fuente de Internet	2%
5	docplayer.es Fuente de Internet	1%
6	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	1%
7	es.scribd.com Fuente de Internet	1%
8	www.somecta.org.mx Fuente de Internet	<1%


Luis Homero Pasquata Uarco

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS



UNTRM

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

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 10:40 horas, el aspirante: Edson Omar Castro Rios, asesorado por M.S. Marilu Hestanzas Mendoza y M.Sc. Glori Tatiana Segura Portocarrero defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: "Potencial bioactivo de pulpa de café para mantener la calidad de semen criopreservado 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 Frias 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 11:50 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
.....	vi
JURADO EVALUADOR DE TESIS.....	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TESIS.....	viii
REPORTE DE TURNITIN	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCION	18
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
2.1. Ubicación	21
2.2. Población, muestra y muestreo.....	22
A. Población	22
B. Muestra.....	22
C. Muestreo.....	22
2.3. Preparación de la pulpa de café	22
2.4. Extracción de los compuestos bioactivos de pulpa de café	22
2.5. Evaluación de la actividad antioxidante de pulpa de café	23
a) Ensayo de captación de radicales 2,2 – difenil – 1 – picilhidrazil (DPPH)	

b)	Ensayo de Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP)	24
2.6.	Evaluación de fenoles totales	24
2.7.	Alimentación de animales	25
2.8.	Colecta de semen	25
2.9.	Refrigeración del semen	25
2.10.	Empajillado de semen	25
2.11.	Criopreservación de semen	26
a.	Evaluación de parámetros cinéticos en CASA	26
b.	Prueba hipoosmotica (HOST)	26
c.	Integridad acrosomal	27
2.12.	Diseño experimental	27
2.13.	Análisis de datos	28
III.	RESULTADOS	29
3.1.	Compuestos bioactivos de la culpa de café	29
3.2.	Semen refrigerado	29
3.3.	Semen Criopreservado	30
IV.	DISCUSION	33
V.	CONCLUSIONES	35
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Capacidad antioxidante y fenoles totales	29
Tabla 2: Porcentajes de motilidad total y motilidad progresiva.	29
Tabla 3: Porcentajes de los parámetros cinéticos (evaluados por el sistema CASA)....	29
Tabla 4: Porcentajes de la prueba de funcionalidad de membrana (HOST).	30
Tabla 5: Porcentajes de la evaluación de integridad acrosomal (BLUE).....	30
Tabla 6: Porcentajes de motilidad total y espermática del toro Brown Swiss, después de congelación con distintas dosis de LPC.	31
Tabla 7: Porcentajes de parámetros cinéticos en espermatozoides de bovino evaluados por el sistema CASA.	31
Tabla 8: Porcentajes de la prueba de funcionalidad de membrana de espermatozoides descongelados.....	32
Tabla 9: Porcentajes de la evaluación de integridad acrosomal de espermatozoides descongelados.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación geográfica de los laboratorios pertenecientes a la UNTRM 21

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Obtencion de liofilizado de pulpa de café.	41
Anexo 2: Evaluaciones seminales microscópicas.	42

RESUMEN

La ganadería es la actividad fundamental en la producción de alimentos y el sustento de la economía agrícola a nivel mundial, la cual se ha beneficiado de los avances en biotecnología. Estos han permitido mejorar diversos aspectos de la producción animal, como el mejoramiento genético, la reproducción asistida, el diagnóstico y prevención de enfermedades, contribuyendo al desarrollo rural a escala global. En la presente investigación se evaluó la adición de liofilizado de pulpa de café (LPC) en semen refrigerado y criopreservado de ganado bovino brown swiss, de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM). Se obtuvo la pulpa del café de la variedad Catimor proveniente del anexo El Ingenio de la provincia de Luya, mediante el proceso de despulpado, secado y molienda. El extracto obtenido fue filtrado y liofilizado. La capacidad antioxidante de dicho producto se determinó mediante los ensayos FRAP, DPPH y Fenoles Totales. Por otro lado, se colectó el semen de bovinos mediante el método de vagina artificial. Para ello se realizaron 10 colectas, a las cuales se adicionó el LPC, evaluando un testigo (T0 = sin adición) y 2 tratamientos (T1=1 mg LPC/ml SD y 2 = mg LPC/ml SD). Las evaluaciones se realizaron en diferentes estados de preservación (refrigerado y criopreservado). Posteriormente se analizaron las características seminales como: motilidad, integridad acrosomal, funcionalidad de membrana y parámetros cinéticos. De las características seminales evaluadas en refrigerado no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos respecto al testigo, lo cual difiere respecto a las evaluaciones en criopreservado, efecto que se presentó en la motilidad progresiva (81,20%) y funcionalidad de membrana (56.58 %) para el T1, además de ello en la integridad acrosomal (88.79%) para el T2 (2 mg), siendo la interpretación de los resultados respecto al tratamiento control (sin adición). Por ende, se concluye que liofilizado de pulpa de café permite mantener las características seminales en los estados de refrigeración y congelación.

Palabras clave: *Antioxidantes, liofilizado, pulpa de café, criopreservado, semen, características seminales, brown swiss.*

ABSTRACT

Livestock farming is the fundamental activity in food production and the backbone of the global agricultural economy, which has benefited from advancements in biotechnology. These advancements have allowed for the improvement of various aspects of animal production, such as genetic improvement, assisted reproduction, disease diagnosis and prevention, contributing to rural development on a global scale. The present study evaluated the addition of freeze-dried coffee pulp (LPC) to refrigerated and cryopreserved semen of Brown Swiss cattle from the National University of Toribio Rodríguez de Mendoza of Amazonas (UNTRM). The coffee pulp was obtained from the Catimor variety from the El Ingenio annex in the Luya province, through a process of depulping, drying, and milling. The obtained extract was filtered and freeze-dried. The antioxidant capacity of this product was determined through FRAP, DPPH, and Total Phenols assays. On the other hand, the bovine semen was collected using the artificial vagina method. For this, 10 collections were made, to which the LPC was added, evaluating a control (T0 = without addition) and 2 treatments (T1=1 mg LPC/ml SD and T2=2 mg LPC/ml SD). The evaluations were carried out in different preservation states (refrigerated and cryopreserved). Subsequently, semen characteristics such as motility, acrosomal integrity, membrane functionality, and kinetic parameters were analyzed. For the semen characteristics evaluated in the refrigerated state, no significant differences were found between the treatments and the control, which differs from the evaluations in the cryopreserved state, where an effect was observed in progressive motility (81.20%) and membrane functionality (56.58%) for T1, as well as in acrosomal integrity (88.79%) for T2 (2 mg), with the interpretation of the results being in relation to the control treatment (without addition). Therefore, it is concluded that freeze-dried coffee pulp allows for the maintenance of semen characteristics in both refrigeration and freezing states.

Keywords: *Antioxidants, freeze-dried, coffee pulp, cryopreserved, semen, semen characteristics, brown swiss.*

I. INTRODUCCION

La ganadería es una actividad importante con diferentes enfoques de producción, siendo la fuente de ingreso de familias y productores. Sin embargo, esta actividad presenta dificultades relacionados a la productividad que derivan principalmente en la reproducción ganadera (Flores & Mamani, 2014; FAO, 2011).

La ganadería bovina es una actividad pecuaria tradicional. Los bovinos son mamíferos del género *Bos*, encontrándose principalmente: *Bos taurus* (Holstein, Angus, Simmental, Brown Swiss, etc.) y *Bos indicus* (Brahman, Gyr, Nelore, etc.). Se caracterizan por sus aspectos reproductivos y productivos. La raza Brown Swiss es de origen suizo, de tamaño mediano a grande, con musculatura corporal robusta, pigmentación marrón oscuro a gris plateado, temperamento y comportamiento dócil, con una gran productividad lechera, así como su adaptabilidad a diversos climas. (Pinta, 2021; Salas & Figueroa, 2012).

El sistema reproductivo del bovino desarrolla un papel muy importante en la reproducción y producción. En las hembras se conforma por ovarios, trompas de Falopio, útero y vagina a diferencia del sistema reproductor del macho agrupado por los testículos (proceso de la espermatogénesis-producción de espermatozoides), epidídimo (maduración de los espermatozoides), conductos deferentes (transportan a los espermatozoides desde el epidídimo hasta la uretra), glándulas accesorias como las glándulas bulbouretrales: vesícula seminal, la próstata, (producción de líquidos que acarrearán al semen), y pene (órgano copulador que deposita el semen en el aparato reproductor de la hembra) (Londra, 2021; Carrillo-González, 2021).

El semen es un fluido biológico con espermatozoides, que cumplen diversas funciones como: fertilización del óvulo, reproducción del macho y reproducción artificial de bovinos. La conservación de material genético (semen) es importante, se puede conservar en refrigerado a 4 °C para uso en periodos cortos y criopreservación o congelado a -196 °C para uso en periodos largos, ambos requieren el uso de diluyente, ya que permite la conservación de material genético. (Almeida *et al.*, 2021)

La criopreservación del semen permite la conservación del material genético de los bovinos para ser utilizado en la inseminación artificial. La inseminación artificial con semen congelado no presenta resultados favorables debido a los daños a nivel de membrana espermática y estrés oxidativo, que afecta la fertilidad (Aquino *et al.*, 2021). Se debe tener en cuenta que los espermatozoides de los mamíferos son muy vulnerables

a los efectos negativos del estrés oxidativo que son causados por moléculas con radicales libres, comprometiendo la viabilidad de los espermatozoides (Cavalheiro *et al.*, 2021)

Los antioxidantes desde el punto de vista zootecnista cumplen una función importante al capturar radicales libres causando daños a las células. Estos pueden ser antioxidantes sintéticos, entre los más comunes destacan BHA (Butilhidroxianisol), BHT (Bitilhidroxitolueno) y TBHQ (Terc-butilhidriquinona). Itzayana *et al.*, (2022) en su investigación encontraron que la adición de antioxidantes en el diluyente comercial en diferentes concentraciones mejora la motilidad espermática en un 13% y 17% comparado con el grupo control y disminuye la producción de EROs (especies reactivas de oxígeno) en un 29% y 18% en los espermatozoides de bovino congelados-descongelados.

Por otro lado, tenemos los antioxidantes naturales, que se encuentran en alimentos de origen vegetal, algunos de estos son las vitaminas C y E, betacaroteno, selenio y flavonoides (Izquierdo & Reyes, 2017; Izquierdo A. C., 2022). Algunas investigaciones han estudiado el uso potencial de antioxidantes obtenidos de plantas aplicados en semen congelado de bovino. Torres *et al.* (2017), determinaron que la adición de extracto de *Rhus trilobata* en semen bovino post descongelado tuvo un efecto positivo en su calidad, logrando una mayor tasa de supervivencia de los espermatozoides en comparación con el tratamiento de control. Pintus & Ros-santaella (2021), reportaron el uso de antioxidantes a partir de compuestos naturales para preservar el esperma de distintas especies (bovinos, porcinos, entre otros), extraídos de diferentes familias de plantas (*Cactaceae*, *Lythraceae*), y describen las mejoras obtenidas respecto a las evaluaciones realizadas a los parámetros cinéticos en semen fresco, congelado y de semen criopreservado.

Gastal (2012), realizó su investigación con el objetivo de determinar el efecto de 3 concentraciones distintas de xantano (0,15; 0,20 y 0,25%) en la calidad seminal de carnero, luego de la descongelación, realizó pruebas para estimar la capacidad antioxidante y las especies reactivas del oxígeno. La adición de xantano no tuvo un efecto benéfico sobre la funcionalidad mitocondrial, la integridad de la membrana y el acrosoma espermático, sin embargo, mostró una buena capacidad antioxidante extracelular, disminuyendo las especies reactivas del oxígeno en el proceso de congelación.

Desde otra perspectiva la pulpa de café viene siendo estudiada como una fuente potencial de antioxidantes, debido a sus componentes ampliamente estudiados (ácido clorogénico, ácido cafeico, polifenoles, vitaminas y minerales) como responsables de prevenir el daño

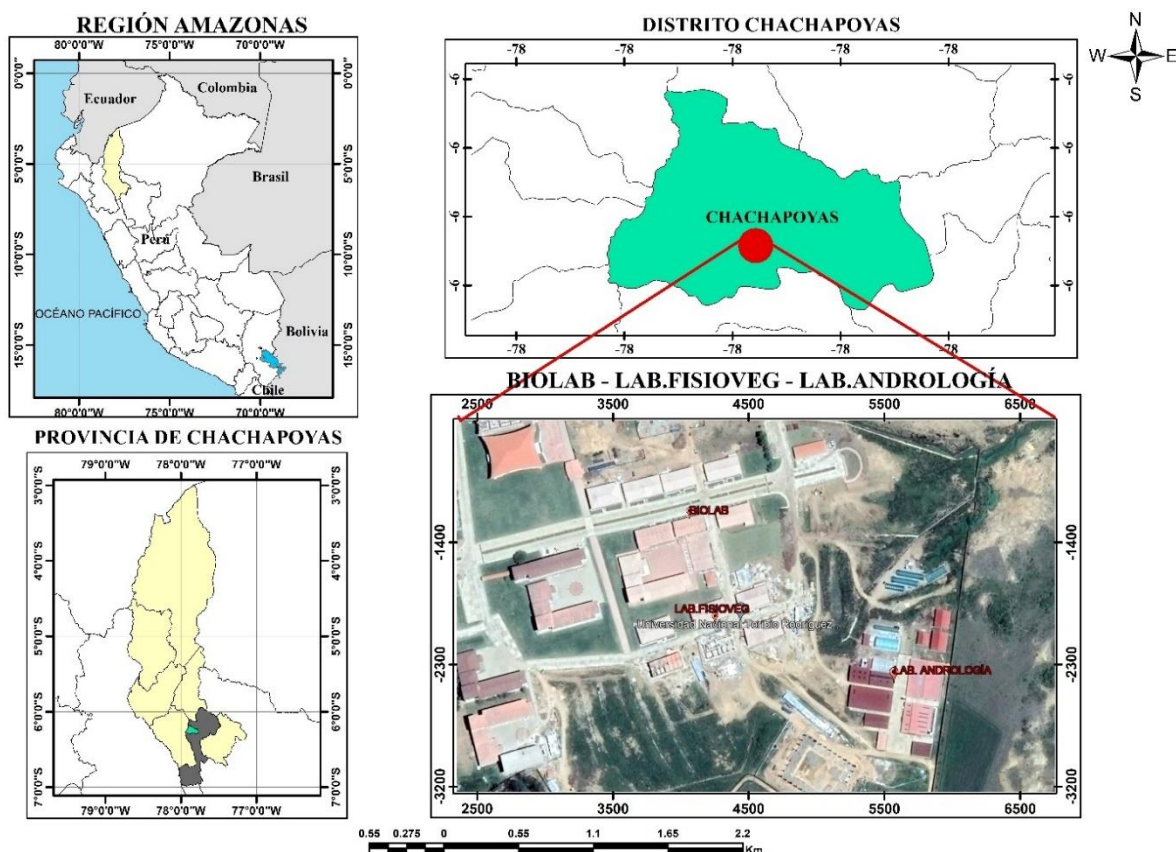
celular ocasionado por radicales libres (Aleman *et al.*, 2018). Por tanto, el uso de residuos con potencial antioxidante en la ganadería es una estrategia sostenible, que por un lado ayudaría a mejorar la eficiencia reproductiva *in vitro*, y por otro generar valor agregado a los desperdicios de la industria cafetalera (Izquierdo & Reyes, 2017). Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial bioactivo de pulpa de café para mantener la calidad en semen criopreservado de ganado bovino.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Ubicación

La investigación se realizó en los laboratorios pertenecientes al Instituto de Ganadería y Biotecnología-IGBI (Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético y Laboratorio de Banco de Semen y Embriones) y del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de la Selva-INDES-CES (laboratorio de Control de Calidad de Café). Ubicados en el campus de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas - UNTRMen la ciudad de Chachapoyas (altitud de 2 483 m.s.n.m. a 6°14' hacia el sur y 77°52' dirección oeste con temperatura promedio de 16°C) (Figura 1).

Figura 1: Ubicación geográfica de los laboratorios pertenecientes a la UNTRM



2.2.Población, muestra y muestreo

A. Población

Estuvo conformada por los bovinos reproductores pertenecientes a la estación experimental de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas – Chachapoyas (UNTRM)

B. Muestra

Un macho reproductor bovino de la raza brown swiss del núcleo genético de la estación experimental de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas – Chachapoyas.

C. Muestreo

Eyaculados obtenidos en las 10 colectas de semen realizadas del toro de raza brown swiss, obtenidas en el laboratorio de Banco de Semen y Embriones.

Obtención de la Pulpa de café

2.3.Preparación de la pulpa de café

Los cerezos de café de la variedad Catimor se colectaron en el anexo El Ingenio, del distrito de Santa Catalina, de la provincia de Luya, Amazonas, Perú. Luego de su recolección se llevó al Laboratorio de Control de Calidad de café, ubicado en el campus de la UNTRM. El proceso de despulpado se realizó de manera manual, con el objetivo de no dañar la pulpa. Posteriormente la pulpa de café se llevó a secar a una estufa (Vintecell-ECOLine, Alemania) a 60°C, hasta obtener una humedad constante. Seguidamente la pulpa de café deshidratada se trituró en un molino ASF-2HP (Bosch-TSM6A013B) hasta obtener un tamaño de partícula uniforme, las muestras se cernieron en un cedazo (100 µm) con el propósito de tener una muestra más homogénea y favorecer la extracción de los compuestos.

2.4. Extracción de los compuestos bioactivos de pulpa de café

Para la extracción de los compuestos bioactivos de pulpa de café se utilizó la metodología optimizada descrita por Myo & Khat-udomkiri (2022) modificada. Para los extractos se pesó 1 g de pulpa seca y molida y se adicionó 22 ml de agua ultrapura. El tiempo de extracción fue de 7 minutos. Las muestras se colocaron en un sonicador (Branson-CPX5800H-E, México) con el fin de mejorar la extracción. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 4800 RPM por 10 minutos filtrado en papel Whatman N° 40. La solución filtrada se colocó en tubos de

centrifuga (Pro-Analytic/Al-CR4000) de 50 ml. Finalmente, las muestras se liofilizaron (Terromi-LC1500 con campana acrílica) por 3 días, previa congelación (SNIJDERS LABS-VF360-86, Netherlands) de la muestra a -84°C por 72 horas. Una vez terminada la extracción de los compuestos bioactivos se procedió a realizar las evaluaciones de actividad antioxidantes y fenoles totales.

2.5. Evaluación de la actividad antioxidante de pulpa de café

Para la determinación de la presencia de antioxidantes se realizaron los ensayos de: captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil -DPPH (Brand-Williams, et al., 1995), poder antioxidante reductor férrico-FRAP (Rufino, et al., 2007) y Fenoles totales (Singleton, et al., 1999), a continuación, se describe cada uno de ellos:

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

La actividad antioxidante se determinó mediante la técnica de captación del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) desarrollada por Brand-Williams (1995) y adaptado por Çelik & Gökmen (2018) para determinar la actividad antioxidante en la pulpa de café. Se peso 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 de DPPH (A_0) a una longitud de onda de 516 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (UV-VIS PEAK, T9200, USA). Luego, en tubos de ensayo se colocó 3.9 ml de solución DPPH y se adiciono 100 μ L del extracto de muestra. Con ayuda de un vórtex se mezcló y coloco en oscuridad durante 10 min, para posteriormente ser medidos a 516 nm (A_s). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se informaron los valores medios. El porcentaje de inhibición de DPPH se calculó utilizando la siguiente ecuación (ecuación 1). Se utilizó el estándar trólox para construir la curva de calibración en un rango de 0 a 1,0 mM y los valores serán expresados en mMol Trolox equivalente/L de extracto.

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

Donde: A_0 : absorbancia de solución de DPPH.

A_T : absorbancia de metanol.

A_S : absorbancia del extracto de muestra.

b) Ensayo de Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP)

Se empleo el método establecido por Ruffino (2010) y Pulido & L. Bravo (2000) con algunas modificaciones. Para preparar el reactivo FRAP se mezcló 25 mL de tampón de acetato 0.3 M, 2.5 mL de TPTZ 10 mM y 2.5 mL de cloruro férrico 20 mM. En un ambiente oscuro se mezcló la solución FRAP (2.7 mL) con 270 μ l de agua destilada y con 90 μ l de extracto de pulpa, y se homogenizo por 30 minutos en un agitador manteniendo los tubos en Baño María a 37 °C. Posteriormente, se realizó la lectura a 593 nm en un espectrofotómetro UV/VIS. Se utilizo la solución FRAP como blanco de calibración. La curva de calibración está construida con sulfato ferroso (FeSO_4) en un rango de 500 a 1000 μ M y los valores se expresaron en μ M FeSO_4 /L de extracto.

2.6.Evaluación de fenoles totales

Los compuestos fenólicos se determinaron por medio del ensayo de colorimetría Folin- Ciocalteu, siguiendo el método desarrollado por Singleton *et al.*, (1999) y descrito por Cadena & Herrera (2008). Se colocó 50 μ l de extracto de cada muestra en tubos de ensayo, después se agregó 1,5 ml de solución Folin acuoso con una concentración 1:10 v/v y finalmente se agregó 1,5 ml de Na_2CO_3 al 7,5% (diluido en agua desionizada). Se dejaron en una estufa a 50° C por 5 minutos para su reacción. Con un espectrofotómetro UV-Visible se realizó 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/g de pulpa.

Obtención del eyaculado seminal

2.7. Alimentación de animales

El bovino evaluado fue ubicado en un box individual. Alimentado a base de heno de alfalfa, ensilado de maíz chala, King Grass, Pasto cuba 22, una cantidad del 10 % de su peso vivo con 4 kilogramos de alimento concentrado. Dispensado diariamente en dos horarios (10:00 am y 4:00 pm)

2.8. Colecta de semen

Se realizó un total de 10 colectas, 2 veces por semana, por el método de vagina artificial. La cual se armó 20 minutos antes de realizar la colecta, conservando la temperatura de 38.5 °C. Seguidamente se procedió a realizar la estimulación del reproductor mediante el olfateo y caminatas cercanas al chantador. En el salto del reproductor se sujetó el prepucio, permitiendo manipular el pene y colocarlo dentro de la vagina artificial para la obtención del eyaculado, para luego transportarlo al laboratorio. Antes de agregar el diluyente (dilutor OptiXcell®) al semen para las evaluaciones, se añadió el extracto liofilizado de pulpa de café (que contiene antioxidantes) para evaluar su efecto sobre las características seminales.

2.9. Refrigeración del semen

Se preparó el dilutor OptiXcell® según las recomendaciones del fabricante, al cual se adicionó el LPC, con el fin de evaluar un testigo (T0 = sin adición) y 2 tratamientos (T1=1 mg LPC/ml semen diluido (SD) y T2 = 2 mg LPC/ml SD) en el semen colectado. Para la dilución del semen, se obtuvo la cantidad requerida de dilutor mediante el cálculo realizado en el equipo fotómetro (Minitube, SDM6 Printer, Alemania), procediéndose a colocar la muestra de semen en tubo de centrifuga de 15ml (Falcon, Alemania) con dilutor en una dilución de 1:1 en refrigeración a 4°C. Para realizar la adición del dilutor cada 10 minutos hasta completar la cantidad requerida, es necesario conservar el dilutor a igual temperatura que la muestra.

2.10. Empajillado de semen

Seguidamente se realizó el empajillado, utilizándose pajillas de 0.5 ml y conservadas a 4°C durante 16 horas previo a la criopreservación, para ello se empleó la máquina automática de envasado y sellado de pajillas (MPP Uno, EE. UU)

2.11. Criopreservación de semen

Se realizó mediante la congelación controlada en nitrógeno líquido, equilibrándose en refrigeración las pajillas de 0.5 ml por 16 horas, para colocarlas en gradilla dentro de una caja de Tecnopor con nitrógeno líquido. Se introdujo una termocupla (Cole-Parmer, Tipo K, EE. UU.), registrando descenso de temperatura de 10 °C cada minuto, hasta alcanzar los -140 °C, proceso que duró de 12 a 15 minutos. Seguidamente se almacenaron las pajillas en tanque de nitrógeno (-196 °C) durante un día hasta su evaluación.

Se descongeló cada pajilla mediante baño maría, a 37.5 °C, por 30 segundos. Posteriormente se cortó un extremo de la pajilla y se colocó el semen en un tubo de microcentrífuga. Finalmente, se realizaron las evaluaciones de las características seminales de modo macroscópica y microscópica (motilidad total, motilidad progresiva, integridad acrosomal, funcionalidad de membrana)

a. Evaluación de parámetros cinéticos en CASA

Para los parámetros cinéticos se realizaron las evaluaciones mediante el sistema SCA (Sperm Class Analyzer - SCA®) para lo cual se realizó una dilución 1:100. Se extrajo una muestra de 10 µl y se colocó sobre una lámina portaobjetos, con una laminilla cubreobjetos para luego observar en el microscopio (Olympus Corporation/Japón). Obteniéndose los siguientes datos: motilidad total, motilidad progresiva, así como parámetros cinéticos: Velocidad lineal, Velocidad media, Velocidad curvilínea, índice de rectitud, Índice de linealidad, amplitud de desplazamiento lateral de cabeza, Índice de oscilación y frecuencia de batido de cola. No obstante, la concentración se midió en el equipo Fotómetro (Minitube, SDM6 Printer, Alemania).

b. Prueba hipoosmótica (HOST)

Se realizó la prueba hipoosmótica adaptado por Jeyendran (1984); en la cual se preparó una solución de 50 mOsm L⁻¹ utilizando D-fructuosa 0,1225 g y citrato de sodio 0,225 g de para 50 mL de agua bidestilada. Se precalentó dos microtubos a 37° C en baño maría y se agregó 100 µl de solución hipoosmótica con 50 µl a una muestra de semen. Este microtubo se incubó por 5 minutos, con 31 µl de medio hipoosmótica formolada (1 ml de solución hipoosmótica + 3 µl de formaldehído 40%) para detener la reacción. Para la evaluación, se colocó 5 µl de muestra sobre una lámina portaobjetos y con una laminilla

cubreobjetos; y se llevó a observación con la ayuda de un microscopio de contraste de fases (Olympus, Japón) a 40X. Los espermatozoides se caracterizaron en base a la función osmótica de su membrana: enrollamiento de la cola de variante intensidad, se consideró una adecuada función osmótica de la membrana espermática (HOST+); sin embargo, si no presenta ninguna respuesta a la solución hipoosmótica ni enrollamiento de cola, se consideró una membrana defectuosa (HOST-) (Jeyerand *et al.*, 1984).

c. Integridad acrosomal

Se realizó mediante la tinción con Coomassie Blue 0,22% Fumuso (2014). Para ello, se utilizó como medio base agua destilada (20 mL) con Brilliant Blue para Coomassie G250 (0,11 g), metanol (25 mL) y ácido acético 99% (5 mL). Se utilizó 10 µL de muestra para preparar un frotis, el cual se dejó secar a ambiente. Seguidamente, los frotis se bañaron en una solución de formaldehído al 4% en PBS por 15 minutos para su fijación, enjuagados en PBS, realizando 5 inmersiones de un segundo cada una. Los frotis se ubicaron en posición vertical para quitar el exceso de PBS y después se sumergieron horizontalmente en solución de Coomassie Blue 0,22% por 5 minutos. Por último, se dejó escurrir el exceso de tinción y se procedió a realizar inmersiones en agua destilada para lavar los frotis (cinco inmersiones de 1 segundo cada una) y secados a temperatura ambiente. Los frotis ya secos se observaron a 40x con aceite de inmersión a través de un microscopio de campo claro para catalogar los espermatozoides. Se catalogó los espermatozoides en base a la pigmentación del acrosoma: pigmentación azul del acrosoma o estructura acrosomal íntegra fueron considerados CB+ (positivos a Coomassie Blue), sin embargo, aquellos con pigmentación blanca del acrosoma o acrosoma dañado fueron considerados CB- (negativos a Coomassie Blue). Se consideraron no menos de 100 espermatozoides por cada muestra.

2.12. Diseño experimental

Las evaluaciones del presente estudio se realizaron mediante el diseño de bloques completamente al azar (DBCA), exclusivamente para los estados de conservación evaluados: refrigeración y criopreservación, los cuales fueron evaluados de manera independiente mediante la aplicación experimental de un

testigo (T0=sin adición) y 2 tratamientos de la siguiente manera: T1= 1 mg de LPC/ml SD) y T2= 2 mg de LPC/ml de SD. Evaluándose en un total de 6 UE.

2.13. Análisis de datos

Se realizó el análisis estadístico descriptivo como la determinación de medias y desviación estándar. Luego se procedió a contrastar los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad (parámetros cinéticos, motilidad progresiva, integridad acrosomal, motilidad total y funcionalidad de membrana) con la prueba de Shapiro Wilk, la prueba de comparación múltiple de Duncan al 5% de significación y la prueba no paramétrica de Kruskal Wails. Se trabajó con el paquete estadístico InfoStat v.2018p.

III. RESULTADOS

3.1. Compuestos bioactivos de la culpa de café

Los valores que se muestran en la tabla 1, son informativos para la pulpa de café y su potencial bioactivo.

Tabla 1: Capacidad antioxidante y fenoles totales

Ensayos	Medias	D.E
FRAP (mg de T Eq/100 ml de LPC)	0.71	0.06
DPPH (mg de AG/100 ml de LPC)	0.47	0.04
FENOLES (mg de AG/100 ml de LPC)	0.70	0.08

3.2. Semen refrigerado

Las evaluaciones realizadas a las muestras de semen de bovino refrigerado no mostraron un efecto significativo ($p > 0.05$), así como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2: Porcentajes de motilidad total y motilidad progresiva.

MOTILIDAD ESPERMÁTICA	Tratamientos con LPC (mg)		
	0	1	2
Motilidad Total (MT%)	98.05 ± 3.92 ^a	99.21 ± 1.05 ^a	99.13 ± 1.23 ^a
Motilidad Progresiva (MP%)	91.21 ± 8.94 ^a	92.81 ± 5.97 ^a	83.68 ± 14.41 ^a

Se muestran las medias de motilidad, medias con igual superíndice no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$).

Los parámetros cinéticos evaluados no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Porcentajes de los parámetros cinéticos (evaluados por el sistema CASA).

PARÁMETROS CINÉTICOS	Tratamientos con LPC (mg)		
	0	1	2
VCL (µm/s)	179.29 ± 30.71 ^a	168.72 ± 35.66 ^a	161.95 ± 25.31 ^a
VAP (µm/s)	102.58 ± 16.48 ^a	100.17 ± 19.51 ^a	91.90 ± 12.30 ^a
VSL (µm/s)	82.52 ± 13.60 ^a	81.28 ± 16.23 ^a	74.58 ± 10.64 ^a
STR (%)	80.45 ± 0.40 ^a	81.94 ± 3.60 ^a	80.96 ± 1.88 ^a
LIN (%)	48.06 ± 3.84 ^a	50.58 ± 5.41 ^a	49.35 ± 6.46 ^a
WOB (%)	59.41 ± 4.73 ^a	61.98 ± 5.82 ^a	60.48 ± 6.56 ^a
ALH (%)	4.31 ± 0.66 ^a	3.93 ± 0.89 ^a	3.92 ± 0.63 ^a
BCF (Hz)	13.48 ± 2.26 ^a	15.05 ± 2.89 ^a	14.45 ± 2.70 ^a

VCL; velocidad curvilínea, *VSL*; velocidad lineal, *VAP*, velocidad media, *WOB*; índice de oscilación *STR*; índice de rectitud, *LIN*; índice de linealidad, *ALH*; amplitud lateral de la cabeza, *BCF*; frecuencia de batida. Medias con igual superíndice no presentan diferencia significativa ($p>0.05$).

El LPC tuvo efecto significativo sobre la funcionalidad de membrana ($p<0.05$) especialmente el tratamiento 1 (1 mg de LPC), como se observa en la tabla 4.

Tabla 4: Porcentajes de la prueba de funcionalidad de membrana (HOST).

Tratamiento con LPC (mg)	HOST + (%)
0	52.27 ± 4.67 ^b
1	58.50 ± 4.28 ^a
2	56.05 ± 3.78 ^{ab}

Se muestran las medias de integridad de membrana, medias con diferente superíndice a y b muestran diferencias significativas ($p<0.05$)

Las pruebas realizadas de integridad acrosomal, no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos aplicados en el semen bovino, dando a ver que la adición LPC no tuvo un efecto significativo, tal como se observa en la tabla 5.

Tabla 5: Porcentajes de la evaluación de integridad acrosomal (BLUE).

Tratamiento con LPC (mg)	BLUE + (%)
0	86.40 ± 4.71 ^a
1	88.11 ± 3.72 ^a
2	89.52 ± 5.22 ^a

Se muestran las medias de integridad acrosomal, medias con el mismo superíndice no muestran diferencias significativas ($p>0.05$)

3.3.Semen Criopreservado

Las evaluaciones realizadas en la motilidad total de semen criopreservado no presentaron cambios significativos ($p>0.05$), sin embargo, las evaluaciones de motilidad progresiva mostraron un efecto significativo ($p<0.05$) siendo los tratamientos 1 (1mg de LPC) los mejores valores obtenidos, tal como se ve en la tabla 6.

Tabla 6: Porcentajes de motilidad total y espermática del toro Brown Swiss, después de congelación con distintas dosis de LPC.

MOTILIDAD ESPERMÁTICA	Tratamientos con LPC (mg)		
	0	1	2
Motilidad Total (MT%)	92.39 ± 4.51 ^a	95.84 ± 3.78 ^a	95.87 ± 4.26 ^a
Motilidad Progresiva (MP%)	62.63 ± 11.96 ^b	81.20 ± 15.62 ^a	70.49 ± 15.49 ^{ab}

Se muestran las medias de motilidad, medias con diferente superíndice a y b muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los parámetros cinéticos VAP, VSL mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) observando que la dosis de 1 mg de liofilizado de pulpa de café tubo mejores resultados respecto al tratamiento control, por otro lado, los demás parámetros cinéticos no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos aplicados, tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: Porcentajes de parámetros cinéticos en espermatozoides de bovino evaluados por el sistema CASA.

PARÁMETROS CINÉTICOS	Tratamientos con LPC (mg)		
	0	1	2
VCL ($\mu\text{m/s}$)	148.75 ± 20.36 ^a	163.64 ± 21.90 ^a	152.92 ± 14.77 ^a
VAP ($\mu\text{m/s}$)	80.11 ± 7.19 ^b	93.45 ± 13.00 ^a	86.51 ± 7.84 ^{ab}
VSL ($\mu\text{m/s}$)	64.50 ± 6.21 ^b	75.74 ± 10.76 ^a	70.49 ± 6.94 ^{ab}
STR (%)	80.32 ± 0.88 ^a	80.81 ± 1.19 ^a	81.26 ± 1.32 ^a
LIN (%)	46.53 ± 3.18 ^a	47.78 ± 1.73 ^a	47.99 ± 2.73 ^a
WOB (%)	57.68 ± 4.13 ^a	56.78 ± 4.31 ^a	57.70 ± 3.88 ^a
ALH (%)	3.78 ± 0.53 ^a	3.99 ± 0.42 ^a	3.89 ± 0.34 ^a
BCF (Hz)	12.66 ± 1.56 ^a	14.41 ± 1.95 ^a	14.07 ± 2.11 ^a

VCL; velocidad curvilínea, VSL; velocidad lineal, VAP, velocidad media, STR; índice de rectitud, WOB; índice de oscilación, LIN; índice de linealidad, ALH; amplitud lateral de la cabeza, BCF; frecuencia de batida. Medias con diferentes superíndices presentan diferencia significativa ($p < 0.05$).

Las evaluaciones de integridad de membrana presentaron un efecto significativo ($p < 0.05$), mostrando que los tratamientos con dosis de 1 mg mostraron mejores resultados respecto al tratamiento control, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Porcentajes de la prueba de funcionalidad de membrana de espermatozoides descongelados.

Tratamiento con LPC (mg)	HOST +
0	52.09 ± 3.41 ^b
1	56.58 ± 3.81 ^a
2	54.55 ± 5.86 ^{ab}

Se muestran las medias de motilidad, medias con diferente superíndice a y b muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Por otro lado, la evaluación de integridad acrosomal mostraron efecto significativo

($p < 0.05$) entre los tratamientos aplicados al semen de bovino, como se observa en la tabla 9.

Tabla 9: Porcentajes de la evaluación de integridad acrosomal de espermatozoides descongelados

Tratamiento con LPC (mg)	BLUE +
0	84.02 ± 4.30 ^b
1	87.12 ± 4.08 ^{ab}
2	88.79 ± 3.54 ^a

Se muestran las medias de integridad acrosomal, medias con diferente superíndice a y b muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

IV. DISCUSION

El presente estudio buscó mostrar los efectos benéficos del liofilizado de pulpa de café (LPC) para mantener la calidad de semen criopreservado. Cuya función de los antioxidantes del liofilizado es inhibir la acción de los radicales libres, para mantener la calidad de semen. Se encontró que el T1 (1 mg de LPC/ ml de SD) presenta diferencias significativas respecto al control en estado de refrigeración solamente para la funcionalidad de membrana (HOST %). A diferencia del estado de criopreservación el cual evidencia diferencias significativas relacionadas a la motilidad progresiva (MP %), así como en algunos parámetros cinéticos evaluados: VAP ($\mu\text{m/s}$) y VSL ($\mu\text{m/s}$) y funcionalidad de membrana. Asimismo, se pudo verificar que el T2 (2 mg de LPC/ ml de SD) si presenta un efecto positivo respecto al control, pero solo para la integridad acrosomal (BLUE⁺ %). Esta adición mostró un efecto positivo significativo en los porcentajes de motilidad progresiva de 62.63% a 81.20%. Estos son diferentes al encontrado por (Luna & Coral, 2015), que no encontraron diferencia significativa al evaluar el efecto de metilxantinas sobre la criopreservación de semen de toros criollos y al reportado por (Ildemar *et al.*, 2022) quienes evaluaron el efecto crioprotector de diferentes fuentes, (Cisteína 2 mM, **Cafeína** 5mM, Ascido Ascorbico 4.5 mg/ml).

El LPC tuvo un efecto significativo en los porcentajes de los parámetros cinéticos VAP de 80.11 % a 93.45 % y, VSL de 64.50 % a 75.74% esto se debe a que los antioxidantes de la pulpa de café actúan neutralizando los radicales libres generados en la criopreservacion. Al ser comparados los datos de esta investigación con los de (Ildemar *et al.*, 2022) que no mostró diferencias significativas respecto a su tratamiento control, de igual forma (Torres, 2018) usó diferentes fuentes de antioxidantes (*Rhus tribolata*, cisteína, **cafeína**, ácido ascórbico) de semen bovino, mostrando que la cafeína no tuvo un efecto significativo.

La adición de LPC mejoro significativamente la funcionalidad de membrana de los espermatozoides aumentando de 52.09 % a 54.55 % con 1 mg de LPC/SD. De igual manera la integridad acrosomal mejoro significativamente de 84.02% a 88.79%, al adicionar 2 mg LPC al semen bovino. Sin embargo, (Ildemar *et al.*, 2022) reporto

datos diferentes a los de la investigación mostrando que no hubo diferencias significativas en ambos parámetros respecto a sus tratamientos control.

Hay pocas investigaciones respecto al liofilizado de pulpa de café usado como fuente de antioxidantes en semen bovino criopreservado. Sin embargo, se reportan investigación de adición de antioxidantes naturales extraídos de diferentes fuentes vegetales la cuales son adicionadas en semen criopreservado de distintas especies.

Se encontró que la motilidad progresiva aumentó significativamente de 62.63% a 81.20 % al adicionar 1 mg de LPC al semen diluido. Estos resultados son superiores a los obtenidos por (Alaya 2022) quien tuvo mejoría de 40% a 45% al adicionar antioxidantes de nopal en semen de equino, y al reportado por (Chávez *et al.*, 2018) quien tuvo un aumento de 35.84% a 51.33% al adicionar extracto de *Moringa oleifer* a 0.5 mg/ml de semen de ovino y a los reportados por (Bojorquez-Salcedo *et al.*, 2022) y (Deppe *et al.*, 2016) quiénes no obtuvieron diferencias al adicionar quercetina y vitamina E en semen de ovino y liofilizado de fruto de Calafate en semen de bovino, respectivamente.

La adición de 1 mg de liofilizado de pulpa de café (LPC) mostro un efecto positivo significativo en los porcentajes de funcionalidad de membrana, aumentando de 52.09% a 56.58% y, la adición de 2 mg de LPC mejoró la integridad acrosomal de 84.02% a 88.79%. Estos resultados son mejores a los reportados por (Gastal, 2012) que no encontró diferencias significativas en la integridad acrosomal, ni en la funcionalidad de membrana de los espermatozoides al adicionar goma de xantana, asimismo, (Deppe *et al.*, 2021) no tuvo diferencias significativas, al usar extracto liofilizado de fruto Calafate en semen de bovino, al igual que (Itzel *et al.*, 2020) que no presento diferencias un efecto significativo en ninguno de los parametros mencionados. Por otro lado, (Deppe *et al.*, 2016) no presento difrencias significativas en la funcionalidad de menbrana al usar extracto de hoja de arándano en semen canino, sin embargo, si incrementó la integridad acrosomal de 48.5% a 55.7%.

V. CONCLUSIONES

- Después de las evaluaciones realizadas (DPPH, FRAP y Fenoles totales) a los extractos de café, se demostró que si hubo presencia de antioxidantes y contenido fenólico.
- Con las evaluaciones de funcionalidad de membrana, motilidad total y parámetros cinéticos en semen criopreservado, la dosis adecuada para mantener la calidad espermática es 1 mg de LPC/ml de SD, mientras que las evaluaciones de integridad acrosomal muestran que la mejor dosis es 2 mg de LPC/ml de SD. Mientras que en semen refrigerado no hubo mejorías ni disminución de los porcentajes en las evaluaciones realizadas.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aleman, S. R., Castillo, F. D., Gonzales, C. N., & Herrera, R. R. (2018). Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su actividad antimicrobiana. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 27(77), 77-79.
- Almeida, J., Jácome, G., López, E., López, F., Mina, K., Paredes, R., Pozo, J., Balarezo, J. (2021). Proceso de colecta y conservacion de semen de un toro (Brown Swiss). *Cantón Tulcán, Provincia del Carchi-Ecuador, Reciena 1(2)*, 16-20.
- Aquino, R. N., Campos, P. S., Rodriguez, B. H., & Juan, R. J. (2021). Adición de la pulpa de cafeen la dieta de ovinos y su efecto en las características seminales. *TECTZAPIC*, 7(2), 65-71.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (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).
- Cadena, T., & Herrera, M. (2008). Evaluación Del Efecto Del Procesamiento Del Cacao Sobre El Contenido De Polifenoles Y Su Actividad Antioxidante. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. *Facultad de Química*, 73.
- Carrillo-González, D. F., Yasser, L. S., Dursun, B., & Carlos, R. J. (2021). Principios basicos de la reproduccion e inseminacion artificial en bovinos, inseminacion artificial y lederazgo rural. Universidad Nacional de Colombia, 20-25. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/81417?show=full>
- Cavalheiro, D. T., Trenkel, C. K., Souza, R. M., & Neto, D. M. (2021). Propriedade antioxidante e toxicidade da noz pecã e seu efeito no sêmen bovino – Resultados parciais. *Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica*, 1(11). <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/15581>
- 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(February), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.048>, 8-14.

- Deppe, M., Jara, A. B., Reyes-Diaz, M., & Risopatron, J. (2021). Efecto de la suplementación del medio de incubación con extracto de *Berberis microphylla* (Calafate) sobre la funcionalidad espermatocítica en semen bovino descogelado. *International Journal of Morphology*; 39(1), 25-31. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022021000100025>
- Deppe, M., Pezo, F., & Risopatron, M. R.-D. (2016). Criopreservación de Espermatozoides de canino con Extracto de Hojas de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *International Journal of Morphology*, 653-659. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022016000200037>
- Echeverry, N. A., Araque, N. V., Rey, M. R., Londoño, G. C., & Aramburo, L. E. (2003). Evaluación de integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 15. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/36838>
- Evans, G., & Maxwell, W. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, Acribia. https://books.google.com.pe/books/about/Inseminacion_Artificial_de_Ovejas_Y_cabra.html?id=z4UWAAAACAAJ&redir_esc=y
- FAO. (2011). Ganadería y seguridad alimentaria mundial. *Vasily Maximov*, 49. <https://www.fao.org/3/i2373s/i2373s02.pdf>
- Fernández, J. V., Gallardo, H. Á., Duarte, D. U., Islas, A. F., Pelayo, M. A., Utrera, Á. R., Reynoso, S. P., Sánchez, J. F. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, vol 12, 38-79. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>,
- Flores, M. L., & Mamani, T. H. (2014). ABC del inseminador de ganado vacuno de leche. *Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA*, 158 <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/758>
- Fumuso, F. G. (2014). Comparison of washing methods and smear conservation periods for llama sperm acrosome assessment using the Coomassie Blue stain. *Spermova*, 4(1), 50-53. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/18690>

- Gastal, G. D. (2012). El xantano como aditivo crioprotector externo para la congelacion de semen ovino. Programa de Pós-Graduação em Veterinária *Universidad Federal de Pelotas*, 28. <https://guaiaca.ufpel.edu.br/handle/123456789/2469>
- Gómez, M., & Migliorisi A, L. (2002). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 9. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf
- Ildemar, B., Abdrés, S. U., Luis, C., Alex, V., & Miguel, M. J. (2022). Evaluacion del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino. *Escuela Superior Politecnica de Chimborazo- Riobamba Polo del Conocimiento*, 7(7) , 1420-1437.
- Itzayana, M.-F., Javier, H.-I., Natalia, C.-F., Angel, C.-C., & Miguel Ángel, L.-V. M. (2022). Efecto de la adición de un antioxidante sobre la actividad mitocondrial y la motilidad del espermatozoide bovino criopreservado. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*. 10(2), www.doi.org/10.47808/revistabioagro.v10i2.429
- Itzel, R.-G., Álvaro, D.-R., Henry, L.-C., Carlos, C.-Z., Maximiliano, T.-M., & Julio, R.-U. (2020). Efecto de los antioxidantes Trolox y Crocina sobre la criopreservación del semen de ovino Pelibuey . *Abanico Veterinario*, ISSN 2448-6132, 10(1), 9. <https://doi.org/10.21929/abavet2020.4>
- Izquierdo, A. C. (2022). Los antioxidantes en la reproduccion y fertilidad de los animales. *BM Editores*, 7. <https://bmeditores.mx/ganaderia/los-antioxidantes-reproduccion-fertilidad-de-los-animales/>
- Izquierdo, A. C., & Reyes, E. I. (2017). Uso de antioxidante en la gandería. *Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana, Sitio Argentino de Produccion Animal*, 5. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/99-Antioxidantes.pdf
- Jeyendran, R. V.-P. (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.
- Londra, T. A. (2021). Microbiologia del semen bovino: Efecto sobre la calidad seminal. *Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales; Universidad Nacional*

del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires., 78.
<https://repositorio.unnoba.edu.ar:8080/xmlui/handle/23601/469>

Myo, H., & Khat-udomkiri, N. (2022). 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>

Omar Camargo, M. V. Z. (2012). Sexual Dimorphism and deviation en the proportion of sexes in preimplantary embryos.*/Dimorfismo sexual y desviación en la proporción de los sexos en embriones preimplantatorios/Dimorfismo sexual e desvio na proporção dos sexos em embriões pré-implantatorios. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(1), 100.

Ormachea, E., Calsin, B., & Zegarra, E. (2019). Cinetica y morfometria espermatica en semen congelado sexado y convencional de toros Brown Swiss. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 500-506.
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14696>

Otero, R. M. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo, identificación de subpoblaciones espermáticas». Santiago de Compostela, Tesis de Doctorado, Facultad de Veterinaria, Universidade Santiago de Compostela.
<http://hdl.handle.net/10347/2406>

Pinta, V. (2021). Brown Swiss: un nombre de marca único para la raza. *Genetica*, 80-89
https://vacapinta.com/media/files/fichero/vp27_art_genetica_cast.pdf

Ros-Santaella, J. L., & Pintus, E. (2021). Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. *Antioxidants*, 10(5), 772. <https://doi.org/10.3390/antiox10050772>

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>

- Ratnawati, D., Luthfi, M., Firdaus, F., & Affandhy, L. (2021, June). Sperms motility of Ongole Crossbreed (OC) Bull at various age. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (Vol. 788, No. 1, p. 012131). IOP Publishing.
- Ruffino, M. S.-J.-C.-F. (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>
- Salas, I. M., & Figueroa, I. M. (2012). Guia tecnica: mejoramiento genetico para engorde de ganado vacuno.Univerisadad Nacional Agraria La Molina, *Agrobanco* 36. <https://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/ctecnica/018-a-ganado.pdf>
- Sánchez, A. S. (2010). Paramentros reproductivos de bovinos en regiones tropicales en México. Tesis de Titulacion, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univerisad Veracruziana, Veracruz 55. https://www.uv.mx/personal/avillagomez/files/2012/12/Sanchez-2010._Parametros-reproductivos-bovinos.pdf
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela - Reventos, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Scientia Horticulturae*, *213*(1974), 284-286.
- Torres, J. M., Ahuir, J. A., Ramirez, B. S., & Barraza, M. E. (2017). Efecto de diferentes fuentes de antioxidantes sobre parametros celulares y capacitacion espermatica por descongelacion en semen bovino. *ResearchGate* 8. <https://www.researchgate.net/publication/325377638>
- Torres, J. V. (2018). Adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos posdescongelamiento. *Doctoral dissertaton, Universidad Autonoma De Chihuahua*.
- Zabala, G. G. (2023). Biotecnologías reproductivas aplicadas en bovinos de carne en la patagonia. *Universidad Nacional de Río Negro. Sede Alto Valle-Valle Medio, Choele Choel, Río Negro. Medicina Veterinaria.*, 63. <http://rid.unrn.edu.ar/handle/20.500.12049/10010>

Anexos

Anexo 1: Obtencion de liofilizado de pulpa de café.



Nota: **A:** Despulpado de café variedad Catimor; **B:** Secado y molienda de pulpa de café; **C:** Pesado y dilución de pulpa de café en agua ultrapura; **D:** Pruebas de DPPH, FRAP Y Fenoles Totales; **E:** Liofilizado de extracto de

Anexo 2: Evaluaciones seminales microscópicas.



Nota: **A:** Colecta de semen del toro Brown Swiss; **B:** Evaluaciones en el sistema CASA; **C:** Evaluación de integridad acrosomal; **D:** Evaluación de Funcionalidad de membrana