

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“PRODUCCIÓN DE METANO Y PARÁMETROS DE
FERMENTACIÓN *in vitro* CON DIFERENTES NIVELES DE
INCLUSIÓN DE TANINOS DE SEMILLA DE UVA”**

Presentada por:

JUAN GUILLERMO PARISUAÑA CALLATA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Lima – Perú

2024

PRODUCCIÓN DE METANO Y PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN IN VITRO CON DIFERENTES NIVELES DE INCLUSIÓN DE TANINOS DE SEMILLA DE UVA

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

10%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

- | | | |
|---|--|-----|
| 1 | www.lavanguardia.com
Fuente de Internet | 1% |
| 2 | academica-e.unavarra.es
Fuente de Internet | <1% |
| 3 | María del Rosario Reyes Alemán, Omar Franco Mora, Edgar Jesús Morales Rosales, Delfina de Jesús Pérez López. "Influencia del magnesio y zinc en la altura de planta y verdor de hojas en Liliium", Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, 2017
Publicación | <1% |
| 4 | "ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE VINOS DE TEMPRANILLO Y CABERNET SAUVIGNON FERMENTADOS Y CONSERVADOS EN HORMIGÓN, ACERO INOXIDABLE Y BARRICAS", 'Universitat Politecnica de Valencia'
Fuente de Internet | <1% |

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“PRODUCCIÓN DE METANO Y PARÁMETROS DE
FERMENTACIÓN *in vitro* CON DIFERENTES NIVELES DE
INCLUSIÓN DE TANINOS DE SEMILLA DE UVA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Presentada por:

JUAN GUILLERMO PARISUAÑA CALLATA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Carlos Alfredo Gómez Bravo
PRESIDENTE

Ph.D. Víctor Hidalgo Lozano
ASESOR

Mg.Quim. María Cecilia Alegría Arnedo
CO-ASESORA

Ph.D. Víctor Guevara Carrasco
MIEMBRO

Mg.Sc. Víctor Vergara Rubin
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mis amados padres Eustaquio y Marta, y a mis queridos hermanos Wilian, Miguel, Luz, Lourdes y Esmeralda, por su apoyo infinito.

A mi maestro, Ph.D. Víctor Hidalgo Lozano, por haberme impartido sus conocimientos.

A mí compañera de vida Grecia, mi cuñado Eloy y a mis cuñadas Susana y Lisbeth, por su constante apoyo durante mis estudios.

A mi hija Nikol Alexandra y a mis seis queridos sobrinos como símbolo de esfuerzo, dedicación, sacrificio y superación en la lucha diaria para obtener lo que uno más anhela.

AGRADECIMIENTO

Al programa de becas CIENCIA ACTIVA CONCYTEC, Convenio de Gestión N° 183-2015 FONDECYT por la subvención de mis estudios de Maestría en Nutrición en la UNALM.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina por brindarme una excelente educación y permitirme formarme profesionalmente.

Al Laboratorio de Nutrición de Rumiantes por permitirme realizar la ejecución de la presente investigación.

Al Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular, por haberme brindado su apoyo en los análisis de mi investigación.

A mi asesor de tesis Ph.D. Víctor Hidalgo Lozano y mi coasesora Mg.Sc. María Cecilia Alegría Arnedo, gracias por su sabiduría y orientación.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	CONTEXTO ACTUAL DE LOS GASES DE EFECTO INVERNADERO SOBRE EL CAMBIO CLIMÁTICO	3
2.2	ESTADO DE EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN EL PERÚ	4
2.3	FISIOLOGÍA DE LA PRODUCCIÓN DE METANO ENTÉRICO	5
2.4	TANINOS	8
2.4.1	Definición y clasificación	8
2.4.2	Efecto de los taninos sobre los factores de fermentación	10
2.4.3	Efecto de los taninos sobre la producción de gas y metano	13
2.4.4	Producción nacional y contenido de taninos del orujo de uva.....	14
2.4.5	Extracción y cuantificación de taninos libres o extractables	17
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	18
3.2	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES, COMPOSICIÓN QUÍMICA, TRATAMIENTOS Y CINÉTICA DE FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	18
3.2.1	Cuantificación de fenoles totales	18
3.2.2	Composición química de los sustratos	19
3.2.3	Niveles de aplicación de los taninos en los tratamientos	20
3.2.4	Procedimiento de incubación <i>in vitro</i>	20
3.3	DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MATERIA ORGÁNICA	23
3.4	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO <i>IN VITRO</i>	23
3.5	DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO AMONÍACAL	24
3.6	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MOLAR DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES	24
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26

4.1 DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MATERIA ORGÁNICA	26
4.2 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO <i>IN</i> <i>VITRO</i>	28
4.3 DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO AMONIACAL	32
4.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MOLAR DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES	34
V. CONCLUSIONES	40
VI. RECOMENDACIONES	41
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
VIII. ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estimación de la emisión de metano proveniente de fermentación entérica y manejo de estiércol.....	5
Tabla 2. Comparación de desechos de uva.....	16
Tabla 3. Contenido medio de compuestos fenólicos en las bayas de las variedades de <i>vitis vinífera</i> más cultivadas en Madrid (expresado en mg/kg de bayas).....	17
Tabla 4. Composición química de los sustratos experimentales.....	20
Tabla 5. Niveles de inclusión de taninos de semilla de uva en los tratamientos.....	20
Tabla 6 Efecto del nivel de inclusión de taninos y tipo de sustrato sobre la digestibilidad de la materia orgánica a las 48 horas.....	27
Tabla 7. Efecto del nivel de inclusión de taninos y tipo de sustrato sobre la producción total de gas a las 48 horas.....	29
Tabla 8. Efecto del nivel de inclusión de tanino y tipo de sustrato sobre la producción de metano a las 24 horas.....	31
Tabla 9. Efecto del nivel de inclusión de tanino y tipo de sustrato sobre la concentración de nitrógeno amoniacal a las 48 horas.....	33
Tabla 10. Efecto del nivel de inclusión de tanino y tipo de sustrato sobre la concentración molar de ácidos grasos volátiles a las 48 horas.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Emisiones por categorías de GEI del sector agricultura para el año 2016 en el Perú.....	4
Figura 2. Fermentación ruminal a partir de la glucosa.....	6
Figura 3. Formación de metano entérico.....	7
Figura 4. Estructuras típicas de taninos.....	9
Figura 5: Producción de vinos y piscos en Perú entre 2001 y 2012.....	15
Figura 6. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la digestibilidad de la materia orgánica después de 48 horas de incubación <i>in vitro</i>	28
Figura 7. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la producción de gas después de 48 horas de incubación <i>in vitro</i>	30
Figura 8. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la producción de metano después de 24 horas de incubación <i>in vitro</i>	32
Figura 9. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la concentración del nitrógeno amoniacal después de 48 horas de incubación <i>in vitro</i>	34
Figura 10. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la concentración de ácidos grasos volátiles después de 48 horas de incubación <i>in vitro</i>	37
Figura 11. Dilución de los taninos de semilla de uva en agua des ionizada para la cuantificación de fenoles.....	51
Figura 12. Ovino Corridale ruminalmente fistulado para la obtención del líquido ruminal.....	51
Figura 13. Filtrado del líquido ruminal a través de cuatro capas de gasa para la preparación del inóculo.....	51
Figura 14. Preparación del inóculo mediante el mezclado del líquido ruminal, saliva artificial y solución reductora.....	51
Figura 15. Pesado del sustrato y los taninos en las botellas de incubación.....	52
Figura 16. Incubación de los tratamientos experimentales para la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica.....	52

Figura 17. Análisis de cenizas para la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica	52
Figura 18. Incubación de los tratamientos experimentales en baño maría para la determinación de la producción de gas y metano.....	52
Figura 19. Cuantificación de la producción de gas utilizando una válvula de 3 vías y un transductor de presiones	53
Figura 20. Sellado de los viales conteniendo las muestras de gas a las 24 horas de medición para su posterior cuantificación de metano	53
Figura 21. Filtrado de contenido ruminal en viales de polietileno después de las 48 horas de incubación	53
Figura 22. Congelación de los viales de polietileno conteniendo el filtrado líquido para su posterior determinación de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles...	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de fenoles y preparación del medio de digestión	51
Anexo 2. Incubación y determinación de la digestibilidad de la materia orgánica.....	52
Anexo 3. Determinación de la producción de gas, metano, nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles	53
Anexo 4. Valores de digestibilidad de la materia orgánica y nitrógeno amoniacal	54
Anexo 5. Valores de producción de gas y metano	55
Anexo 6. Valores de la concentración molar de ácido acético y propiónico.....	56
Anexo 7. Valores de la concentración molar de ácido isobutírico y butírico.....	57
Anexo 8. Valores de la concentración molar de ácido isovalérico y valérico.....	58

ACRÓNIMOS

AGVs: Ácidos grasos volátiles

ATP: Adenosin trifosfato

CH₄: Metano

CO₂: Dióxido de carbono

DCA: Diseño completamente al azar

DMO: Digestibilidad de la materia orgánica

GEI: Gases de efecto invernadero

GgCO₂eq: Giga gramos de dióxido de carbono

H₂: Di hidrogeno

HA: Heno de alfalfa

MS: Materia seca

N₂O: Óxido nitroso

NH₃: Nitrógeno Amoniacal

PC: Paja de cebada

PG: Producción de gas

PPB: Partes por billón

PPM: Partes por millón

PPMM: Partes por mil millones

TC: Taninos condensados

TSU: Tanino de semilla de uva

RESUMEN

La continua búsqueda de alternativas que permitan mitigar las emisiones de metano han propiciado la utilización de metabolitos secundarios de las plantas en la dieta de los rumiantes. El uso racional de taninos es una medida dietética importante para la reducción de metano, no obstante, su efecto variable depende en gran medida de su origen vegetal, tipo, dosis y de los sustratos sobre el cual actúa. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del nivel de inclusión de taninos de semilla de uva (TSU) sobre la producción de metano y los parámetros de fermentación *in vitro* en paja de cebada (PC) y heno de alfalfa (HA). Para ello, se utilizaron 40 botellas de vidrio que fueron distribuidas aleatoriamente en seis tratamientos (tres niveles: 0, 4 y 8 por ciento de TSU en dos sustratos: paja de cebada y heno de alfalfa) considerando seis repeticiones por tratamiento, además de cuatro blancos. Se determinó la digestibilidad de la materia orgánica (DMO), producción de gas (PG), metano (CH₄), nitrógeno amoniacal (NH₃) y ácidos grasos volátiles (AGVs) mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. Los datos fueron sometidos a ANOVA bajo DCA con arreglo factorial de 3*2 y la comparación de medias se realizó a través de la prueba de Tukey utilizando el *Software* estadístico Rstudios 4.2.2. La DMO y la concentración de NH₃ fueron afectadas ($p < 0.05$) por la interacción nivel*sustrato, observando que el nivel de inclusión de 8 por ciento de TSU redujo la digestibilidad de la materia orgánica en la PC, también disminuyó la concentración de nitrógeno amoniacal en el HA. No hubo efecto significativo por parte de la interacción de los factores en las variables PG, CH₄ y AGVs. Al evaluar el desempeño individual de los factores, la producción de gas y metano disminuyeron con la inclusión del 8 por ciento de TSU ($p < 0.05$). La concentración de ácido propiónico, isobutírico, isovalérico y valérico fueron afectadas ($p < 0.05$) por el tipo de sustrato pero la interacción nivel*sustrato y nivel de inclusión no influyeron en los mismos. La concentración del ácido propiónico fue mayor en la PC, sin embargo, la concentración del ácido isobutírico, isovalérico y valérico fue mayor en el HA. En conclusión, la interacción de los factores con un nivel de inclusión del 8 por ciento de TSU redujo la DMO y NH₃ en PC y HA pero no hubo efecto mitigador de CH₄ ni se encontraron cambios en la PG y AGVs, a pesar de esto, el análisis del impacto individual del factor nivel de inclusión indica que la producción de CH₄ disminuye al incluir un 8 por ciento TSU.

Palabras clave: Semilla de uva, tanino, metano, parámetros de fermentación, *in vitro*.

ABSTRACT

The continuous search for alternatives that allow mitigating methane emissions has led to the use of secondary plant metabolites in ruminant diets. The rational use of tannins is an important dietary measure for methane reduction; however, their variable effect depends largely on their plant origin, type, dosage and the substrates on which it acts. In this context, the objective of the present study was to evaluate the effect of the inclusion level of grape seed tannins (GST) on methane production and *in vitro* fermentation parameters in barley straw (BS) and alfalfa hay (AH). For this purpose, 40 glass bottles were used, and randomly distributed in six treatments (three levels: 0, 4 and 8 percent GST in two substrates: barley straw and alfalfa hay) considering six replicates per treatment, in addition to four blanks. Organic matter digestibility (OMD), gas production (GP), methane (CH₄), ammonia nitrogen (NH₃) and volatile fatty acids (VFAs) were determined using the *in vitro* gas production technique. Data were subjected to ANOVA under DCA with 3*2 factorial arrangements and comparison of means was performed by Tukey's test using Rstudios 4.2.2 statistical software. OMD and NH₃ concentration were affected ($p < 0.05$) by the level*substrate interaction, noting that the inclusion level of 8 percent GST reduced organic matter digestibility in BS, it also reduced ammonia nitrogen concentration in AH. There was no significant effect of the interaction of the evaluated factors on the variables GP, CH₄ and VFAs. When evaluating individual performance of the factors, gas and methane production decreased with the inclusion of 8 percent GST ($p < 0.05$). The concentration of propionic, isobutyric, isovaleric and valeric acids were affected ($p < 0.05$) due to substrate type but there was no influence due to interaction level*substrate and inclusion level. Propionic acid concentration was higher in BS, however, isobutyric, isovaleric and valeric acid concentration was higher in AH. In conclusion, the interaction of the factors with an inclusion level of 8 percent of GST reduced OMD and NH₃ in BS and AH but there was no mitigating effect of CH₄ nor were changes found in GP and VFAs, despite this, the analysis of the individual impact of the inclusion level factor indicates that CH₄ production decreases when including 8 percent GST.

Keywords: Grape seed, tannin, methane, fermentation parameters, *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

Los gases del efecto invernadero son imprescindibles para mantener una temperatura adecuada para la vida en el planeta (15°C en promedio). Sin embargo, el aumento acelerado de las concentraciones de estos gases en la atmósfera han conllevado a una mayor absorción de energía provocando un desequilibrio en el balance energético del planeta (diferencia entre la radiación solar y la reflejada), y en consecuencia un incremento gradual de la temperatura ambiental (calentamiento global) (Barry y Chorley 2003). Esta problemática en gran parte es atribuida a las emisiones de los gases de efecto invernadero de origen antropogénico (Marín 2013). En febrero del 2022 la concentración media mundial del dióxido de carbono en la superficie de la tierra fue 418.19 partes por millón (ppm), es decir, 2.67 ppm más que las registradas en el mismo mes del año 2021 (NOAA 2022). Los principales gases asociados al fenómeno del calentamiento global son el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄), el óxido nitroso (N₂O) y los compuestos halogenados, siendo los directos responsables de ser causantes de la generación de diversos eventos meteorológicos extremos, como huracanes, sequías, inundaciones, entre otros, siendo esto a su vez una grave amenaza para la seguridad alimentaria en el planeta (Benavides y León 2007).

Al respecto, el metano es el gas de efecto invernadero que ha incrementado de forma acelerada sus concentraciones atmosféricas en el último siglo, debido principalmente al aumento de sus emisiones antropogénicas (fermentación entérica en rumiantes, cultivo de arroz, explotación de combustibles fósiles, etc.) (Cardona *et al.* 2017). Alcanzando una concentración atmosférica de 1892.3 ppb y un incremento anual de 15.3 ppb en el año 2020 (NOAA 2020).

Específicamente, los rumiantes contribuyen con el 18 por ciento del total de metano producido en el mundo (Beauchemin *et al.* 2007). Su formación es el principal modo de eliminación de hidrógeno generado como producto principal de la fermentación

microbiana producida en el rumen (Vargas *et al.* 2012), responsable además de la pérdida de energía (7 a 10 por ciento) aportada por el alimento (Carmona *et al.* 2005). Al respecto, se está investigando varias estrategias para mitigar las emisiones de metano entérico, a través, de estudios *in vitro* e *in vivo*, siendo la manipulación dietético nutricional con mayor atención actualmente (Vélez *et al.* 2017).

Por otro lado, como resultado complementario a las actividades principales de la industria vitivinícola, se generan residuos agroindustriales que representan cantidades significativas y son considerados un problema ambiental cuando no son utilizados eficientemente (Restrepo *et al.* 2011). Referente a ello, se ha demostrado previamente el contenido considerable de metabolitos secundarios que posee la semilla de uva (Surco *et al.* 2020), como los taninos, los cuales presentan propiedades bioactivas que permiten modificar los patrones de fermentación y mitigar las emisiones de metano en rumiantes (Durmic y Blache 2012).

El efecto de los taninos sobre la producción de metano y la utilización del nitrógeno del alimento varía dependiendo del tipo de tanino (peso molecular, fuente o subunidad), concentración, sustrato dietético y tipo animal (Aboagye y Beauchemin 2019). La inmensa diversidad en la estructura de los taninos pueden dilucidar los distintos efectos sobre la metanogénesis (Pellikaan *et al.* 2011), no obstante, otros estudios no han podido detectar efecto alguno en la producción de metano (Muñoz-Cuautle *et al.* 2022). Al respecto, se necesita más investigación para clarificar el efecto de los taninos de semilla de uva en las emisiones de metano.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del nivel de inclusión de taninos de la semilla de uva sobre la producción de metano y los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* en la paja de cebada y heno de alfalfa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CONTEXTO ACTUAL DE LOS GASES DE EFECTO INVERNADERO SOBRE EL CAMBIO CLIMÁTICO

En el mundo se han venido experimentando un incremento en las concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero, estos gases son liberados a la atmósfera tanto por fuentes naturales como antropogénicas, los niveles atmosféricos de estos gases alcanzaron niveles máximos históricos en el último decenio, lo cual supone otra fatídica advertencia del cambio climático (Veizaga 2012). El cual representa la mayor preocupación de diferentes organizaciones como la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), entre otras, que trabajan en aras de mejorar la calidad del ambiente (Steinfeld *et al.* 2009).

El aumento de las concentraciones de estos gases provoca un calentamiento de la superficie terrestre y la destrucción de la capa de ozono en la estratósfera (Primavesi *et al.* 2004), las concentraciones atmosféricas de estos gases han aumentado desde 1750 debido a la actividad humana. En el 2021, las concentraciones de dióxido de carbono fueron de 415.7 partes por millón (ppm), las de metano, de 1 908 partes por mil millones (ppmm), y las de óxido nitroso, de 334.5 ppm. Estos valores constituyen con el 149, el 262 y el 124 por ciento, respectivamente de los niveles preindustriales, que corresponden a las concentraciones existentes antes de que las actividades humanas empezaran a alterar el equilibrio natural de esos gases en la atmósfera. Las observaciones directas de cambios recientes, a escala global son el aumento de la temperatura media en el aire y en los océanos, el derretimiento de nieve y hielos, y el aumento del nivel medio del mar (OMM 2022).

2.2 ESTADO DE EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN EL PERÚ

En América Latina y el Caribe se emiten por lo menos el 14 por ciento de las emisiones de metano a nivel mundial y el Perú contribuye con menos del 1.0 por ciento de GEI a nivel global (Bernaouda *et al.* 2017). En el país, la principal fuente de emisiones de GEI proviene del sector agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra con 134 901.58 GgCO₂eq, que representa el 65.71 por ciento de las emisiones netas (MINAM 2021). En el año 2016, las emisiones de GEI del sector Agricultura fueron de 25 910.29 GgCO₂eq, representado el 12.62 por ciento del total de emisiones a nivel nacional. La principal fuente de emisión es la subcategoría fermentación entérica con 11 462.85 GgCO₂eq representando un 44.24 por ciento del total, seguida por la subcategoría emisiones directas de N₂O de suelos gestionados con 7 709.86 GgCO₂eq representando el 29.76 por ciento (Figura 1). Estas dos subcategorías representan el 74 por ciento de las emisiones totales del sector (MINAM 2021).

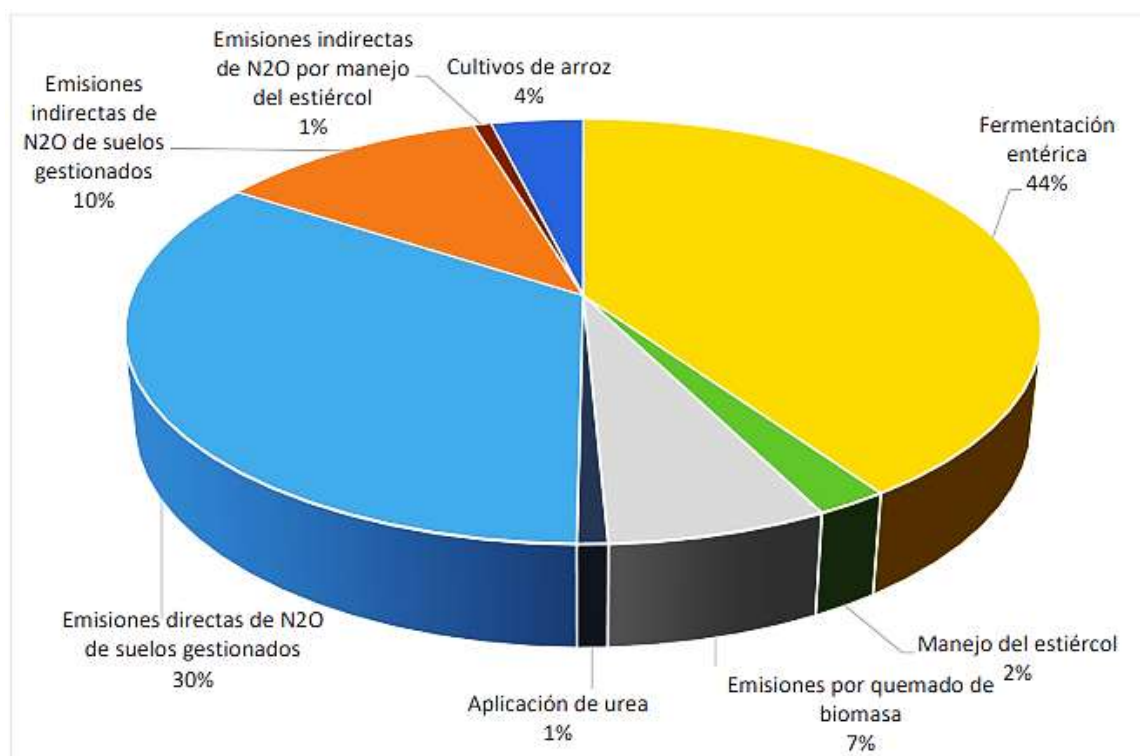


Figura 1. Emisiones por categorías de GEI del sector agricultura para el año 2016 en el Perú

Fuente: MIDAGRI (2020)

El principal GEI emitido es el CH₄ que representa el 52.58 por ciento de las emisiones totales del sector. Estas emisiones son generadas principalmente por la subcategoría fermentación entérica. El segundo GEI corresponde al N₂O con un 46.41 por ciento, generado principalmente por las subcategorías emisiones directas e indirectas de N₂O de suelos gestionados (MINAM 2021).

Tabla 1: Estimación de la emisión de metano proveniente de fermentación entérica y manejo de estiércol

ESPECIE	Población Animal Cabezas / año	Factores de emisión de metano por manejo de estiércol por T°			Emisión por fermentación entérica		Emisión por manejo de estiércol		Emisión Total	
		Frio (<15 °C)	Templado (15-25°C)	Cálido (>25°C)	Gg / año	%	Gg / año	%	Gg / año	%
Vacas lecheras	895,718	1.00	1.00	2.00	77.9	16.8	0.93	7.94	78.9	16.6
Otro ganado	4,639,737	1.00	1.00	1.00	260	56.0	4.64	39.6	264	55.6
Ovinos	11,450,659	0.10	0.15	0.20	57.3	12.3	1.33	11.4	58.6	12.3
Caprinos	1,879,713	0.11	0.17	0.22	9.4	2.0	0.31	2.65	9.71	2.04
Caballos	526,290.56	1.09	1.64	2.19	9.47	2.0	0.75	6.4	10.2	2.15
Mulas / Asnos	590,007.71	0.60	0.90	1.20	5.9	1.3	0.47	4.01	6.37	1.34
Porcinos	904,700.42	1.00	1.00	2.00	0.9	0.2	1	8.54	1.9	0.4
Alpaca	4,319,229.00	0.17	0.26	0.34	34.6	7.4	0.82	7	35.4	7.43
Llama	1,105,017.00	0.28	0.42	0.56	8.84	1.9	0.35	2.99	9.19	1.93
Ave	49,559,797.50	0.01	0.02	0.02		0.0	0.96	8.2	0.96	0.2
Cuyes	3,584,640.10	0.04	0.04	0.04	0.15	0.0	0.15	1.28	0.3	0.06
Total					464	100.0	11.71	100	476	100

Fuente: MINAM (2021)

2.3 FISIOLÓGÍA DE LA PRODUCCIÓN DE METANO ENTÉRICO

Los rumiantes poseen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con altos contenidos de carbohidratos estructurales, en alimentos de alta calidad nutritiva, la carne y la leche. Sin embargo, por sus características innatas, este mismo sistema digestivo también produce metano. La metanogénesis es de particular importancia en los rumiantes, ya que por este proceso se liberan el 97 por ciento del metano que es producido por estos animales (Berra y Finster 2002).

Los carbohidratos ingeridos por los rumiantes se degradan en monómeros por acción microbiana. Posteriormente, estos monómeros siguen la ruta de la glucólisis para su fermentación (Ramirez 2018). El piruvato obtenido en la glucólisis es convertido en AGV, principalmente en acético, propiónico y butírico, a través de distintas rutas metabólicas. El acetil-CoA producido a partir del piruvato por reacciones fosforoclasticas es metabolizado a acetato, a través de acetil-fosfato, o a butirato, a través de acetoacetyl-CoA (Figura 2). La producción total de $\text{NADH}+\text{H}^+$, H_2 y CO_2 por molécula de glucosa fermentada hacia acetato o butirato es: $2 \text{ NADH} + 2 \text{ H}^+$, durante la glucólisis, y $2 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2$, durante la descarboxilación del piruvato (Ramirez *et al.* 2014). La producción de AGV e H_2 deben de ser retirados del rumen para evitar efectos nocivos en el animal (Vargas *et al.* 2012).

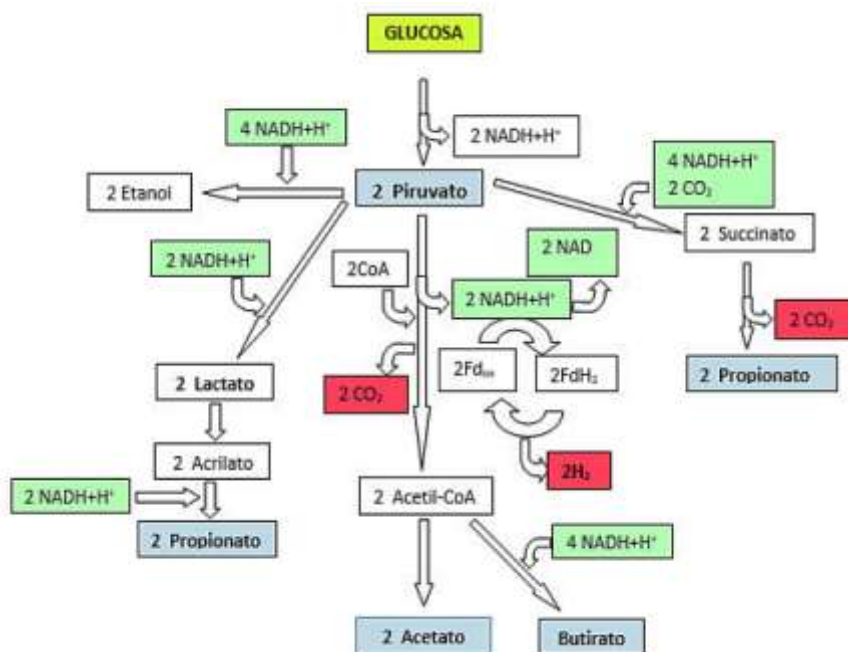
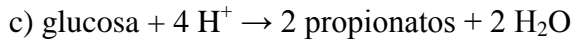
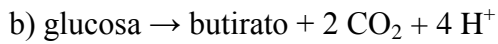
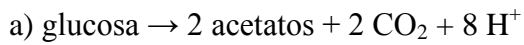


Figura 2. Fermentación ruminal a partir de la glucosa

Fuente: Ramirez *et al.* (2014)

Los ácidos grasos volátiles producidos, son rápidamente absorbidos en el rumen y utilizados como fuente de energía (Beauchemin 2007), mientras otros metabolitos producidos en este proceso fermentativo como el dióxido de carbono y el hidrogeno, no son utilizados por el animal, pero sirven como sustrato para la comunidad de microorganismos metanógenos en su sistema, los cuales producen metano como estrategia para obtener energía para su crecimiento (Kim y Gadd 2008). Según la vía metabólica y de

acuerdo al AGV producido, el balance de hidrogeniones es el siguiente (Relling y Mattioli 2008):



Por ende, se sugiere que para formar un CH₄, se necesitan 8 H⁺ (tomados de 4 NADH + H⁺ o FADH₂ que deben oxidarse).

Los metanógenos usan inmediatamente el H₂, éste no se acumula en el rumen. De hecho, trazas de H₂ en el rumen pueden inhibir la actividad de hidrogenasa y limitan la oxidación de los azúcares, cuando no hay rutas alternativas para la eliminación de H₂. Las arqueas metanogénicas utilizan el H₂ disponible y lo combinan con el CO₂ formando metano (figura 3). Es decir, el CO₂ se reduce sucesivamente a CH₄ por acción del H₂ como donador primario de electrones a través de formilo, metilo, metileno y metilo – intermedio (Qiao *et al.* 2014).

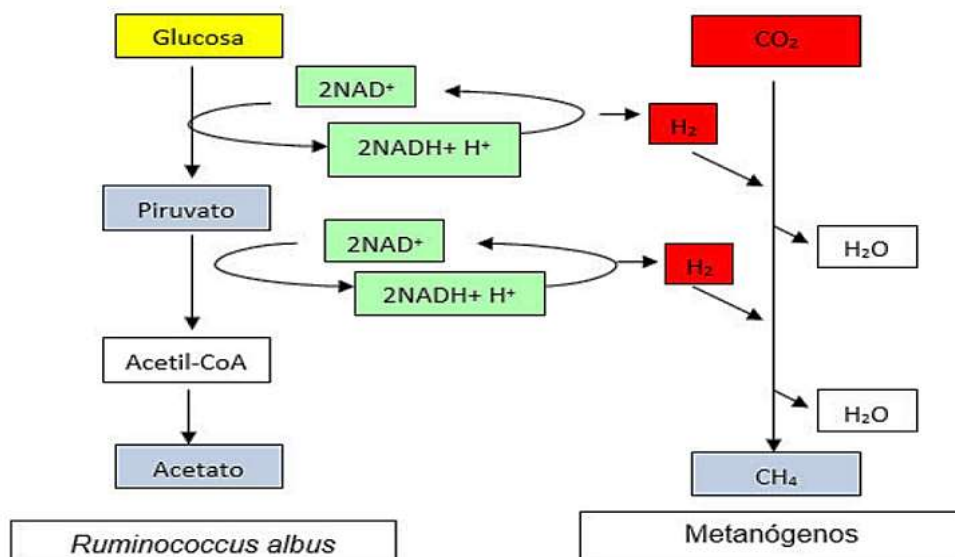


Figura 3: Formación de metano entérico

Fuente: Kim y Gadd (2008)

2.4 TANINOS

2.4.1 Definición y clasificación

Los taninos son polímeros polifenólicos solubles en agua, de alto peso molecular. La presencia de un gran número de grupos hidroxilo fenólicos les brinda la capacidad de formar complejos principalmente con las proteínas y en menor medida con iones metal, aminoácidos y polisacáridos. Se pueden encontrar en arbustos y árboles forrajeros, leguminosas, frutas y granos de cereales (Makkar y Becker 2007).

Según su estructura molecular, los taninos se clasifican en hidrolizables y condensados. Estos dos grupos se caracterizan por sus propiedades químicas y bioactivas muy diferentes (Vasta *et al.* 2019).

- **Taninos hidrolizables.** Son moléculas complejas con un poliol como núcleo central (e.g. glucosa, glucitol, ácidos quínico, quercitol, siquímico) los cuales son esterificados parcial o totalmente con un grupo fenólico como el ácido gálico (3, 4, 5-trihidroxi benzoico; galotaninos) o el ácido gálico dímero hexahydroxydiphenic (elagitaninos). Los grupos fenólicos restantes pueden ser esterificados u oxidados para producir más taninos hidrolizables complejos (Patra y Saxena 2011).
- **Taninos condensados.** También llamado proantocianidinas, son principalmente polímeros de las unidades flavan-3-ol (epi) catequina y (epi) galocatequina, que están unidos por enlaces interflavonoides C4-C8 y C4-C6. También se encuentran presentes otros monómeros de los taninos condensados, por ejemplo las profisetinidinas, probinetidinas y proguibortinidinas. Uno de los taninos más comunes “quebracho (*Schinopsis balansae*)” es del tipo de las profisetinidinas. El número de unidades monoméricas pueden variar y esto determina el grado de polimerización de di- tri- y tetraflavonoides a oligómeros superiores, estos pueden generar una gran cantidad de estructuras químicas y producir diferentes propiedades biológicas (Figura 4) (Patra y Saxena 2011).

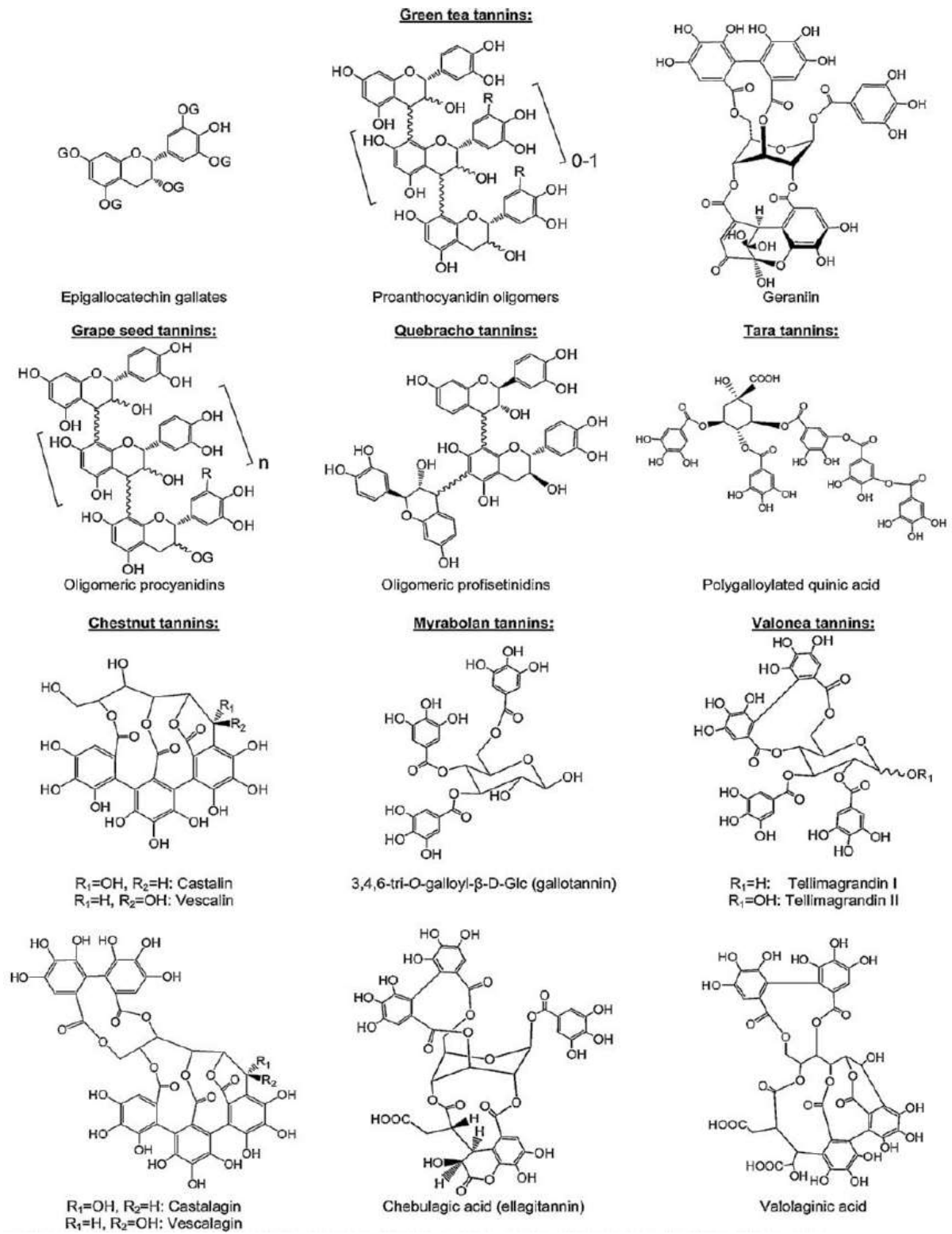


Figura 4. Estructuras típicas de taninos

Fuente: Pellikaan *et al.* (2011)

2.4.2 Efecto de los taninos sobre los factores de fermentación

a. Efecto de los taninos sobre la digestibilidad del alimento

Las concentraciones de taninos superiores al 5 por ciento en las dietas podrían afectar de forma negativa el consumo voluntario del animal. Diversos estudios han demostrado, en pruebas *in vitro* e *in vivo* que los taninos reducen la digestibilidad de los alimentos, por ello una concentración de taninos superior al 5 por ciento en la dieta no solo puede afectar el consumo voluntario sino también la utilización de nutrientes del alimento y por tanto la productividad animal, por lo cual es de suma importancia considerar el estudio de dosis apropiadas de taninos a suministrar en una dieta para lograr la reducción de la producción de CH₄ sin tener un efecto negativo en el consumo y metabolismo ruminal (Bhatta *et al.* 2009). Estos efectos claramente dependerán del tipo de tanino y la concentración de estos en la planta utilizada (Waghorn 2008).

Al respecto, Tiemann *et al.* (2006) observaron que la digestibilidad aparente de la materia seca *in vitro* se redujo con cualquier adición de taninos sin importar su origen. Sin embargo, la magnitud de la reducción varía por el origen de los taninos. La mayor disminución en digestibilidad se observó con taninos de *Calliandra 22310*, seguida por taninos de *Calliandra 22316* y *Flemingia*, mientras que, los taninos de *Leucaena* mostraron el menor efecto sobre la digestibilidad. Asimismo, la degradación de la materia seca y orgánica disminuyó debido a la suplementación con taninos, pero no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes extractos ricos en taninos evaluados (Wischer *et al.* 2013).

El estudio del nivel de inclusión de taninos condensados (0, 2, 4 y 6 por ciento) de las hojas de Sengon (*Albizia falcatoria*) sobre la dieta base (pasto *Brachiaria mutica* y alimento balanceado en la proporción 60:40), observaron una disminución de la digestibilidad de la materia seca y orgánica *in vitro* (Afzalani *et al.* 2022). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kondo *et al.* (2014) y Yuliana *et al.* (2014), donde la suplementación de taninos del fruto de Lerak (*Sapindus rarak*) y los subproductos de té causaron disminución de la digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

b. Efecto de los taninos sobre la proteína del alimento

Los taninos reducen la degradación de la proteína en el rumen a través de la formación de complejos entre estos compuestos, previniendo la degradación por los microorganismos (Patra y Saxena 2010). Al respecto, Kariuki y Norton (2008) observaron que los efectos beneficiosos de los taninos en los rumiantes están asociados con la mayor absorción de aminoácidos especialmente en los animales alimentados con forrajes que contenían de 2 - 4 por ciento de taninos. El complejo tanino - proteína previene la degradación de las proteínas en el rumen y de esta manera aumentan el flujo de aminoácidos en el intestino delgado. El pH en el rumen (6.0 – 7.0) es favorable para la formación de estos complejos, pero cuando estos complejos pasan al abomaso el pH es más bajo (2.5 - 3.5), se produce la ruptura de este enlace permitiendo una mejor digestión de los aminoácidos en el intestino delgado.

Tiemann *et al.* (2006) reportaron que la degradación aparente de la proteína cruda disminuye ($p < 0.05$) por la adición de taninos. En promedio, la degradación de la proteína fue de 61 por ciento sin taninos, 40 – 45 por ciento con 25 mg de taninos, 20 – 30 por ciento con 50 mg, menos de 18 por ciento con 75 mg y menos que 7.5 por ciento con 100 mg de taninos. No obstante, al evaluar la fermentación ruminal y la producción de metano *in vitro* adicionando 4 por ciento de taninos condensados (*Silva feed*, 86 por ciento) observaron que la concentración de nitrógeno amoniacal no fue afectada por el tratamiento, encontrando valores estadísticamente similares a la dieta control (Muñoz-Cuautle *et al.* 2022).

La inclusión de *Leucaena leucocephala* (taninos condensados: 69.3 mg EC/g MS) y *Opuntia ficus-indica* (taninos condensados: 3.1 mg EC/g MS) como sustituto del heno de alfalfa en la fracción forrajera sobre la producción de nitrógeno amoniacal. Observaron reducciones del 26.5, 28.7 y 18.4 por ciento con el T₂ (20 por ciento: heno de alfalfa, 30 por ciento: *Leucaena* y 50 por ciento: concentrado), T₃ (20 por ciento: heno de alfalfa, 30 por ciento: *Opuntia ficus-indica* y 50 por ciento: concentrado) y T₄ (20 por ciento: heno de alfalfa, 30 por ciento: *Opuntia ficus-indica* fermentado y 50 por ciento: concentrado), respectivamente, en comparación al T₁ (50 por ciento: heno de alfalfa y 50 por ciento: concentrado) (Araiza *et al.* 2020). Además, Terranova *et al.* (2018) evaluaron el efecto de

18 plantas leñosas que contenían taninos sobre la producción de metano y amoníaco *in vitro*, encontrando una reducción de 35 por ciento de concentración de amoníaco en comparación con la dieta control.

En tanto, Cappucci *et al.* (2021) estudiaron la adición de dos tipos de taninos condensados (Mimosa y Gambier) y dos tipos de taninos hidrolizables (Castaño y Tara) (4g/100g MS) a un alimento basal (cebada 48 por ciento, salvado de trigo 23 por ciento, heno de alfalfa 15 por ciento, harina de soya 10 por ciento, melaza 2 por ciento y suplemento vitamínico mineral 2 por ciento) reportando diferencias estadísticas entre tratamientos; con el tratamiento control observaron mayor producción de amoníaco, pero menor producción con el tratamiento que contenía taninos de Mimosa. De igual manera, el efecto de la suplementación de taninos condensados de las hojas de *Sengon* (T1: 2 por ciento, T2: 4 por ciento y T3: 6 por ciento) sobre la producción de amoníaco, disminuyó significativamente en 3.93 (T1), 3.59 (T2) y 3.26 mM (T3), en relación al tratamiento control (6.45 mM) (Afzalani *et al.* 2022). Asimismo, la concentración de amoníaco *in vitro* disminuyó con la inclusión de diferentes extractos de taninos excepto por el Mirabolán y la mayor producción se produjo con la inclusión del extracto de Castaña (Wischer *et al.* 2013).

c. Efecto de los taninos sobre la producción de ácidos grasos volátiles

En un estudio la suplementación con taninos condensados (Mimosa y Gambier) e hidrolizables (Castaña y Tara) (4g/100 g MS) a una dieta basal, observaron variación en el perfil de ácidos grasos volátiles. Asimismo, reportaron un valor medio del acetato significativamente mayor al resto de los tratamientos con la adición de tanino Gambier (Cappucci *et al.* 2021). Por otro lado, Afzalani *et al.* (2022) evaluaron el efecto de los taninos condensados de las hojas de *Sengon* en diferentes niveles de inclusión (0, 2, 4 y 6/100 g MS) sobre la producción de ácidos grasos volátiles totales, notando una disminución a medida que incrementaron el nivel de inclusión de taninos. La concentración de los AGV totales en este estudio varió entre 123 a 178 mM, siendo aún óptimo para satisfacer las necesidades de energía microbiana.

En otro estudio reportaron que la inclusión del 10 por ciento de diferentes extractos de taninos (Castaña, Semilla de uva, Myrabolan, Sumach y Valonea) afectó significativamente la producción de ácidos grasos volátiles, a excepción del propionato, cuya producción promedio fue de 10.6 mmol/día en todos los tratamientos. Sin embargo, la producción de acetato disminuyó en un 19 por ciento por la inclusión del extracto de castaña, mientras que la semilla de uva y myrabolan incrementaron la producción de acetato en un 22 y 13 por ciento, respectivamente, en relación al control (Wischer *et al.* 2013). Mientras que, en otro estudio la adición de 4 por ciento de taninos condensados en la dieta, no disminuyó la producción de ácidos grasos volátiles en comparación al tratamiento control (Muñoz-Cuautle *et al.* 2022).

2.4.3 Efecto de los taninos sobre la producción de gas y metano

El efecto de los taninos sobre la metanogénesis aún no se entiende completamente. Se ha encontrado que pueden inhibir el crecimiento o la actividad de las bacterias metanógenas y protozoarios del rumen por medio de mecanismos bactericidas o bacteriostáticos. También puede afectar a las bacterias celulolíticas y consecuentemente la fermentación de los carbohidratos hasta ácidos grasos de cadena corta, en especial la producción de acetato, de esta manera se reduce la formación de CO₂ e H₂ necesarios para la metanogénesis (Bodas *et al.* 2012).

La acción de los taninos sobre la inhibición del crecimiento de las bacterias metanógenas dependerá del tipo de tanino y de las dosis suministradas. Al respecto, en un estudio observaron que la disminución de la producción de metano dependerá de la especie de la planta y de su familia (Piluzza *et al.* 2013). Por otro lado, la actividad antimetanogénica de los taninos se atribuye principalmente a los taninos condensados los cuales disminuyen la producción de metano a través de una reducción en la digestión de la fibra. Tiemann *et al.* (2008) evaluó el efecto de 2 leguminosas tropicales (*Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophylla*) conocidas por su contenido de taninos condensados sobre la emisión de metano en corderos y encontró una reducción en la emisión de metano de 24 por ciento, pero a causa de la reducción en la digestibilidad de la materia orgánica y fibra. Así mismo, al evaluar el efecto de diferentes niveles de taninos condensados extraídos de *Leucaena*

leucocephala (0, 15, 20, 25 y 30 ml), en pruebas *in vitro*, la producción de metano (ml/g MS) y las poblaciones de archaea metanogénicas y protozoos, mostraron una reducción lineal con el incremento del nivel de taninos (Tan *et al.* 2011).

Por otra parte, los efectos de la inclusión de 5 y 10 por ciento de diferentes extractos tánicos (Castaña, Mimosa, Quebracho, Tara, Roble, Cacao, Semilla de uva, Myrabolan, Sumach y Valonea) sobre la formación de metano indican que todos los extractos, excepto la tara redujeron la producción de metano entre 8 y 28 por ciento sin alterar la producción de gas. En un segundo experimento evidenciaron que el extracto de castaña causó la mayor reducción de la producción de metano seguido por la valonea, semilla de uva y sumach, mientras que el extracto de myrabolan no redujo la concentración de metano (Wischer *et al.* 2013). Sin embargo, al evaluar los productos de la fermentación *in vitro* por el efecto de la adición de taninos condensados (4g/100g MS), observaron que la producción de gas no fue afectada por la inclusión de taninos, asimismo, la adición de taninos no afectó la producción de metano (Muñoz-Cuautle *et al.* 2022).

2.4.4 Producción nacional y contenido de taninos del orujo de uva

La uva es una de las frutas de mayor cultivo en el mundo, con una producción superior a 77 millones de toneladas en el 2013, cerca del 80 por ciento es usado en la industria del vino generando grandes cantidades de residuos. Muchos investigadores han realizado estudios de la valorización de los residuos del procesamiento de la uva, considerándolo como un reto en el aspecto ecológico y económico (Rouquié *et al.* 2017).

En el 2010 el Ministerio de la Producción informó una producción de más de un millón de litros de pisco. Por otro lado, la producción de vinos y otros espumantes ha crecido igualmente en la última década: cerca de diez millones de litros en el mismo año. En la Figura 5 se observa, según el Ministerio de la Producción, el crecimiento de estas dos bebidas alcohólicas (Ministerio de la Producción 2014).



Figura 5: Producción de vinos y piscos en Perú entre 2001 y 2012

Fuente: Ministerio de la Producción (2014)

En la actualidad la producción de pisco sigue creciendo, llegando a 3,764; 4,191 y 4,183 miles de litros durante los años 2015, 2016 y 2017 respectivamente (INEI 2017). Sin embargo, el incremento en la producción de los subproductos de la uva estaría generando desechos que actualmente no tienen ningún otro uso industrial o agrícola. Estos residuos orgánicos pueden resultar altamente contaminantes para el medio ambiente, por eso, la legislación obliga a tratar este tipo de desechos antes de liberarlos en el suelo o en las aguas (Restrepo *et al.* 2011).

El principal desecho que se genera tras la elaboración de licores es el orujo. Este es el desecho sólido excedente de la producción de vinos y piscos, consiste en tallos de uva (25 por ciento), semillas (25 por ciento) y cáscaras (50 por ciento) que no son aprovechados (Duba y Fiori 2015). Durante el año 2010 estos desechos alcanzaron las 2 mil toneladas (Ramos 2015). En la Tabla 2 se observan los detalles de la producción de cada uno de los desechos.

Tabla 2: Comparación de desechos de uva

	Desechos por 100 kg de uva (kg)	Desechos por producción de vino y pisco (kg) en el 2010
Escobajo	5	635 805.48
Orujo	4	508 664.38
Semilla	10	1 017 288.77

Fuente: Ramos (2015)

Esto significa que solo en el 2010, para la producción de vinos y piscos hubo una producción de desechos de mil toneladas de semillas de uva y 500 toneladas de escobajos y orujo. Luego de realizar estimaciones en base a métodos de regresión lineal, se observó que entre los tres subproductos para el año 2017 se llegaría cerca de 3 400 toneladas (Ramos 2015).

Los orujos son los residuos sólidos que poseen una riqueza cualitativa y cuantitativa en constituyentes fenólicos, que comprenden sobre todo los ácidos fenólicos, los antocianos, que son pigmentos rojos (Ferreira *et al.* 2002). La concentración de los constituyentes fenólicos tiende a aumentar durante toda la maduración, aunque no linealmente. Los antocianos aparecen durante el envero y se acumulan durante la maduración, produciéndose al final un descenso en su concentración que suele coincidir con la sobre maduración de la uva. La cantidad de taninos en el hollejo también va a aumentar durante el periodo de madurez, alcanzando un máximo para luego mantenerse más o menos constante. Mientras que, la concentración de taninos de las semillas desciende desde el envero, al mismo tiempo que aumenta su grado de polimerización (Mazza *et al.* 1999).

Blouin y Guimberteau (2004), mencionan que los compuestos fenólicos están presentes en la uva, en sus constituyentes como baya, en las semillas y en el hollejo, como se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3: Contenido medio de compuestos fenólicos en las bayas de las variedades de *vitis vinífera* más cultivadas en Madrid (mg/kg de bayas)

Compuestos Fenólicos	Pulpa	Hollejos	Semillas
Taninos	Trazas	100 a 500	1000 a 6000
Antocianos	0 ⁽¹⁾	500 a 3000 ⁽²⁾	0
Ácidos Fenólicos	20 a 170	50 a 200	0
Flavonoles y Flavanoles	0	10 a 100	0

(1) Excepto variedades tintóreas

(2) Contenido en variedades tintas

Fuente: Blouin y Guimberteau (2004)

2.4.5 Extracción y cuantificación de taninos libres o extractables

Vargas (2006) describe el método de extracción y cuantificación de taninos a través de solventes orgánicos. Primero pesar de 15 a 20 g de muestra en elermeyers de 250 ml y adicionar la solución extractora 45 ml (acetona más ácido ascórbico), luego agitar aproximadamente durante 75 minutos. Retirar la muestra de los elermeyers y exprimirla en los embudos a los beakers utilizando doble gasa. Transvasar la muestra exprimida de los elermeyers a tubos falcon de 50 ml (dos tubos por muestra). Adicionar a los tubos igual cantidad de éter dietílico, agitar y succionar el éter por vacío, realizar este lavado tres veces con similar volumen (10 ml/muestra). Repetir el paso anterior, pero adicionando esta vez etil acetato, agitando y succionando por vacío, hacer esto tres veces. Posteriormente evaporar la acetona, éter y etil acetato preferiblemente en un concentrador de muestras (con agujas). Finalmente, almacenar las muestras en la congeladora. Al día siguiente, agregar metanol 50 por ciento (50 ml) agitar con el vórtex y centrifugar durante 15 minutos a 3500 rpm. Luego transvasar el sobrenadante a las botellas con sephadex quedando en el fondo el pellet que se descarta. Las botellas de sephadex más extractos de taninos se adiciona metanol 50 por ciento (130 ml) a cada botella, luego agitar y centrifugar por 5 minutos a 3500 rpm (eliminar el sobrenadante). Repetir el proceso de centrifugación de sephadex más metanol hasta que el líquido quede transparente. Cuando el líquido este transparente cambiar el metanol 50 por ciento por acetona al 70 por ciento y repetir las centrifugaciones por 5 minutos cada vez recuperando el sobrenadante en tubos nuevos con papel filtro. Posteriormente, el sobrenadante recuperado en beakers llevar al concentrador de muestras para evaporar la acetona y luego congelar y llevar al liofilizador (2-3 días).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Nutrición de Rumiantes (LNR) y en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) del Departamento Académico de Nutrición, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), el cual se encuentra ubicado en el distrito de La Molina, provincia y departamento de Lima, a 12° 04' 55.95'' de latitud Sur, 76° 56' 21.52'' de longitud Oeste y a una altura de 247 msnm. El estudio tuvo una fase pre experimental que consistió en la alimentación de ovinos fistulados con los sustratos utilizados en la investigación y una fase experimental que consistió en la evaluación de los tratamientos en dos corridas experimentales dentro de un sistema *in vitro*.

3.2 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES, COMPOSICIÓN QUÍMICA, TRATAMIENTOS Y CINÉTICA DE FERMENTACIÓN *IN VITRO*

3.2.1 Cuantificación de fenoles totales

Se utilizó un extracto rico en taninos de semilla de uva que fue adquirido de la empresa Ajinomoto Natural Specialities – Bélgica, con una concentración de polifenoles del 97.3 por ciento según el fabricante.

La cuantificación de los taninos se realizó mediante el método Folin-Ciocalteu de acuerdo con Makkar *et al.* (1993) para corroborar los valores otorgados por el fabricante. Por consiguiente, se tomaron 50 µl del extracto para luego trasladarlo a un tubo de ensayo y fue llevado a un volumen igual a 500 µl con agua des ionizada, luego se adicionó 250 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.25 ml de solución acuosa de carbonato de sodio al 20 por

ciento. Posteriormente, después de 40 min se midió la absorbancia a 725 nm. La cuantificación se expresó como equivalentes a ácido gálico.

La concentración de fenoles totales fue de 97.37g expresados en ácido gálico presentes en 100 g de muestra de semilla de uva (97.37 por ciento). Este dato obtenido es similar al valor reportado por el fabricante (concentración de poli fenoles: 97.3 por ciento). La razón de utilizar este extracto en el experimento proviene de la información de varios estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, que tiene la propiedad de mitigar la producción de metano y modificar los parámetros de fermentación. Las dosis que se probaron fueron elegidas teniendo en cuenta a las recomendaciones de Waghorn *et al.* (1997), que mencionan que dosis menores a 10 por ciento (como porcentaje de la materia seca) no presentan efectos negativos; como también fue informado por Wischer *et al.* (2013), quienes probaron dos niveles de inclusión (5 y 10 por ciento) de diferentes extractos tánicos concluyendo que el extracto de semilla de uva fue superior al resto de extractos evaluados en cuanto a la disminución de la producción de metano y nitrógeno amoniacal *in vitro* sin modificar negativamente la fermentación.

3.2.2 Composición química de los sustratos

Se utilizaron como alimentos sustratos: Heno de alfalfa (*Medicago sativa*) con una calidad nutricional alta y paja de cebada (*Hordeum vulgare*) con una calidad nutricional baja. Estas muestras fueron secadas a 60°C durante 48 horas, para proceder a la molienda usando un tamiz de 1 mm de diámetro con un molino de cuchillas de acero marca Willy, al finalizar, las muestras se depositaron en recipientes herméticos para su conservación y posterior análisis.

Los sustratos molidos fueron sometidos a análisis químico por triplicado. El contenido de proteína cruda, materia seca, cenizas y fibra detergente neutra fueron determinados según los procedimientos del análisis proximal (AOAC 2005) y de Van Soet *et al.* (1991). La composición química se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición química de los sustratos experimentales

Composición química	Sustratos	
	Paja de cebada	Heno de alfalfa
Materia Seca	90.59	93.49
<i>En base a MS:</i>		
Proteína Cruda	5.05	15.68
Cenizas	7.02	9.52
Fibra detergente neutro	50.27	44.75

Fuente: Laboratorio de Evaluación nutricional de alimentos, Departamento Académico de Nutrición, UNALM

3.2.3 Niveles de aplicación de los taninos en los tratamientos

Para cada tipo de sustrato se aplicaron tres niveles de inclusión de taninos tal como se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Niveles de inclusión de taninos de semilla de uva en los tratamientos

Tratamiento	Sustrato	Porcentaje de tanino
T1	Paja de cebada	0
T2	Paja de cebada	4
T3	Paja de cebada	8
T4	Heno de alfalfa	0
T5	Heno de alfalfa	4
T6	Heno de alfalfa	8

3.2.4 Procedimiento de incubación *in vitro*

- a. **Preparación del medio de digestión.** Para obtener la saliva artificial primero se preparó por separado las siguientes soluciones:

- **Solución micro mineral (A):**

Para preparar 1000 ml se pesó los siguientes reactivos: 13 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 8 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Luego se mezcló todos los reactivos en una fiola de 1000 ml y se enrazó con agua destilada.

- **Solución Buffer (B):** se pesó 35 g de NaHCO_3 y 4 g de NH_4HCO_3 y luego se vertió ambos reactivos en una fiola de 1000 ml y se enrasó con agua destilada.
- **Solución macro mineral (C):** se pesó 5.7 g de Na_2HPO_4 , 6.2 g de KH_2PO_4 y 0.6 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, luego se vertió todos los reactivos en una fiola de 1000 ml y enrazó con agua destilada.
- **Solución resarzurina (D):** se pesó 0.1 g de resarzurina y se enrazó con agua destilada en una fiola de 100 ml.
- **Solución reductora (E):** se pesó 625 mg de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 625 mg de L-Cisteina HCl, luego se vertió en una fiola de 100 ml. Se midió 4 ml de NaOH 1 N y se vertió en la misma fiola de 100 ml y luego se enrazó con agua destilada.

Luego de haber preparado las soluciones requeridas se realizó los siguientes pasos:

- En un matraz de 1000 ml, se mezcló 400 ml de agua destilada, 0.1 ml de la solución A, se agitó hasta disolver, luego se añadió 200 ml de solución B, 200 ml de solución C y 1 ml de solución D.
- Posteriormente, se mantuvo la mezcla a 39 °C y se burbujeó con CO_2 durante 1 a 2 horas hasta que la resarzurina cambie de rojo a incoloro.

b. Preparación de las botellas de incubación

Las botellas antes del inicio de la prueba fueron lavadas y secadas en una estufa a 100 °C durante 12 horas y fueron gaseadas con CO₂. Luego se rotularon las botellas de vidrio de 100 ml y se pesaron 0.5 g de sustrato para cada uno de los tratamientos.

Se utilizaron en total 40 botellas de incubación, que correspondieron a seis tratamientos con seis repeticiones cada una, también se utilizaron cuatro blancos que contenían el inoculo, pero no el sustrato.

c. Preparación del líquido ruminal

Se extrajo el líquido ruminal de dos ovinos Corridale fistulados, que consumían una dieta estándar a base de paja de cebada y heno de alfalfa. La recolección del contenido ruminal se realizó 2 horas después de proporcionar la ración matutina. Para ello se utilizaron termos con agua a 39°C procurando la menor exposición con el oxígeno. Luego se extrajo manualmente el contenido ruminal, posteriormente se filtró a través de 4 capas de gasa y se recolectaron 10 ml de filtrado por muestra (para 20 muestras). Finalmente, el filtrado fue llevado en matraz de 1000 ml previamente calentado a 39°C y gaseado con CO₂ en forma continua y simultánea.

d. Preparación del inóculo

En un matraz de 1000 ml se vertió simultáneamente 200 ml de líquido ruminal, 800 ml de saliva artificial y 40 ml de la solución reductora y se gaseó con CO₂ a 39 °C durante el mezclado de los ingredientes y soluciones (preparación para 20 muestras).

e. Incubaciones

Después de pesar el sustrato en las botellas de vidrio limpias y secas, se aplicó las respectivas dosis de taninos diluidos con la ayuda de una micro pipeta una hora antes de la

inclusión del inoculo. Posteriormente se adicionaron 2 ml de agua destilada y se llevó a 39°C en una estufa. Luego se tomó 50 ml del inoculo preparado y con un dispensador se transfirió a los frascos, procurando gasear simultáneamente con CO₂ por un lapso de 15 segundos. Las botellas o frascos estuvieron debidamente sellados con tapón de hule de neopreno y casquillos de aluminio. Se colocaron en un baño maría a 39°C posteriormente se tomaron los datos de producción de gas, metano, ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal.

3.3 DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LA MATERIA ORGÁNICA

La digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica se midió a las 48 h de incubación. La metodología utilizada fue de Goering y Van Soest (1970) y acreditado por la AOAC (2005), los valores se expresaron en porcentaje.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO *IN VITRO*

Para la determinación de la producción de gas se utilizó un sistema de válvulas de tres salidas sobre las cuales se acopló una aguja de 0.6 mm, fue insertada a través de cada una de las tapas de hule de cada botella; la presión fue registrada por medio de un transductor de presiones. Los valores se expresaron en ml/g de MS del sustrato, que estimado mediante la ecuación cuadrática propuesto por Mauricio *et al.* (1999).

$$\text{Volumen de gas} = 0,18 + 3,697 \times \text{presión de gas (PSI)} + 0,0824 (\text{presión de gas})^2$$

La producción de gas se cuantificó a las 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas, registrándose las presiones P1, P2, P3, P4, P5 y P6, respectivamente y poniendo a CERO la presión después de cada lectura. La producción total de gas fue determinada como la sumatoria de las producciones parciales en las horas de muestreo. Las muestras de gas de 24 horas de medición fueron conservadas en viales al vacío para su posterior determinación de la producción de metano.

Del gas colectado en los viales a las 24 horas se tomó una muestra de 0.6 ml, que se inyectó manualmente al puerto de inyección del cromatógrafo de gases (Agilent 7890B) equipado con un detector ionización de flama (FID). La detección de la muestra fue por la columna GS-GASPRO de 30 m y 0.32 mm, específica para la cuantificación de CH₄. Los valores se expresaron en ppm.

3.5 DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO AMONICAL

Para determinar el nitrógeno amoniacal de las muestras se tomaron 10 ml del medio y 120 µl de ácido sulfúrico al 20 por ciento. Luego se dejaron reposar para luego congelar a -30 °C hasta el día de su análisis. Se utilizó la metodología de hipoclorito fenólico del laboratorio de NFREC (Chaney y Marbach 1962). Los valores se expresaron en µmol/ml.

3.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MOLAR DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

Después de la determinación de la digestibilidad *in vitro* después de 48 horas de incubación se procedió a filtrar el contenido ruminal usando papel Whatman N° 541. Luego se tomaron 10 ml del filtrado y se dejó reposar para luego congelarlo a -30°C hasta el día de su análisis. Al momento de su análisis, se descongelaron hasta que alcance una temperatura ambiente. Para la determinación de los ácidos grasos volátiles se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent 7890B) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Los valores se expresaron en mM.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2*3, considerando a los sustratos como a los niveles de inclusión de taninos dentro de los tratamientos (Factor A: 2 sustratos; Factor B: 3 niveles de inclusión de taninos), cada tratamiento tuvo 6 repeticiones. El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} : es la variable en estudio

μ : es la media general

α_i : es el efecto del nivel i ésimo del factor A (efecto del sustrato)

β_j : es el efecto del nivel j ésimo del factor B (efecto del nivel de inclusión del tanino)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = es la interacción entre el nivel i ésimo del factor y el nivel j ésimo del factor B
(efecto de la interacción del tipo de sustrato y el nivel de inclusión del tanino)

E_{ijk} : es el error experimental

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) a través del paquete estadístico Rstudios versión 4.2.2, seguido de una prueba de comparación de medias de la prueba de Tukey con un nivel de significancia $P < 0.05$, para aquellos análisis que presentaron diferencias estadísticas.

Cuando la interacción no fue significativa se realizaron contrastes entre los efectos principales (Control vs dosis; dosis máxima vs dosis mínima).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LA MATERIA ORGÁNICA

En la Tabla 6 se observa el porcentaje de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica sin y con la inclusión de taninos de semilla de uva. Los resultados indican que existe diferencia estadística en la interacción de los factores sustrato y nivel de inclusión. El tratamiento que contiene paja de cebada con 8 por ciento de inclusión de taninos (T3) presenta una digestibilidad de la materia orgánica similar al tratamiento T6 (heno de alfalfa con 8 por ciento de taninos) pero menor al resto de tratamientos ($P < 0.05$). En otras palabras, la inclusión de dosis alta de taninos en los diferentes sustratos disminuye la digestibilidad de la materia orgánica (Figura 6). Estos resultados coinciden con los de Cantet *et al.* (2019) quienes indican que con la aplicación de la dosis más alta de taninos (4.5 mg TC/100 mg MS) observaron una disminución de la digestibilidad de la materia seca, orgánica y fibra detergente neutro del ryegrass. Además, este resultado está en concordancia con lo obtenido por Gomaa *et al.* (2017) y Afzalani *et al.* (2022), quienes reportaron que la inclusión de taninos condensados de las hojas de Sengon y de plantas taníferas produjeron una disminución de la digestibilidad de la materia seca y orgánica. Sin embargo, Wischer *et al.* (2013) y Pámanes *et al.* (2020) quienes experimentaron la inclusión de taninos de diferentes extractos tánicos y hojas de *Cucurbita foetidissima*, respectivamente, no encontraron diferencias estadísticas en la digestibilidad de la materia seca.

Tabla 6. Efecto del nivel de inclusión de taninos (g/100g MS) y tipo de sustrato sobre la digestibilidad de la materia orgánica

		Digestibilidad de la materia orgánica
		Porcentaje
Nivel	0	70.39 ± 1.68
	4	68.70 ± 1.65
	8	66.49 ± 1.86
Sustrato	Paja de cebada	68.26 ± 2.84
	Heno de alfalfa	68.79 ± 1.74
Paja de cebada	0	70.96 ^a ± 1.73
	4	68.43 ^{ab} ± 1.73
	8	65.40 ^c ± 1.66
Heno de alfalfa	0	69.81 ^{ab} ± 1.55
	4	68.98 ^{ab} ± 1.68
	8	67.58 ^{bc} ± 1.43
Probabilidad		
Nivel		0.0000
Sustrato		0.3269
Nivel*Sustrato		0.0152

^{ab}: Medias con letras distintas en la misma columna son diferentes a la Prueba de Tukey (P<0.05)

Los efectos negativos sobre la degradación de la materia seca y orgánica por la inclusión de niveles altos de taninos pueden deberse a la formación de complejos con los carbohidratos y proteínas de los sustratos según lo sugerido por Bueno *et al.* (2020), quienes indican que la interacción de los taninos con las proteínas y polisacáridos dificulta la degradación por los microorganismos del rumen. Igualmente, McSweeney *et al.* (2001) sugieren que puede deberse al efecto directo de los taninos en los microorganismos que degradan las fibras inhibiendo la acción específica de las enzimas celulolíticas. Sin embargo, con dosis bajas de inclusión de taninos no muestran diferencias estadísticas en la digestibilidad de la materia orgánica tal como es reportado por Costa *et al.* (2018) quienes indican que las bacterias pueden responder mediante modificaciones en su metabolismo después de un reducido periodo de adaptación a niveles bajos de taninos.

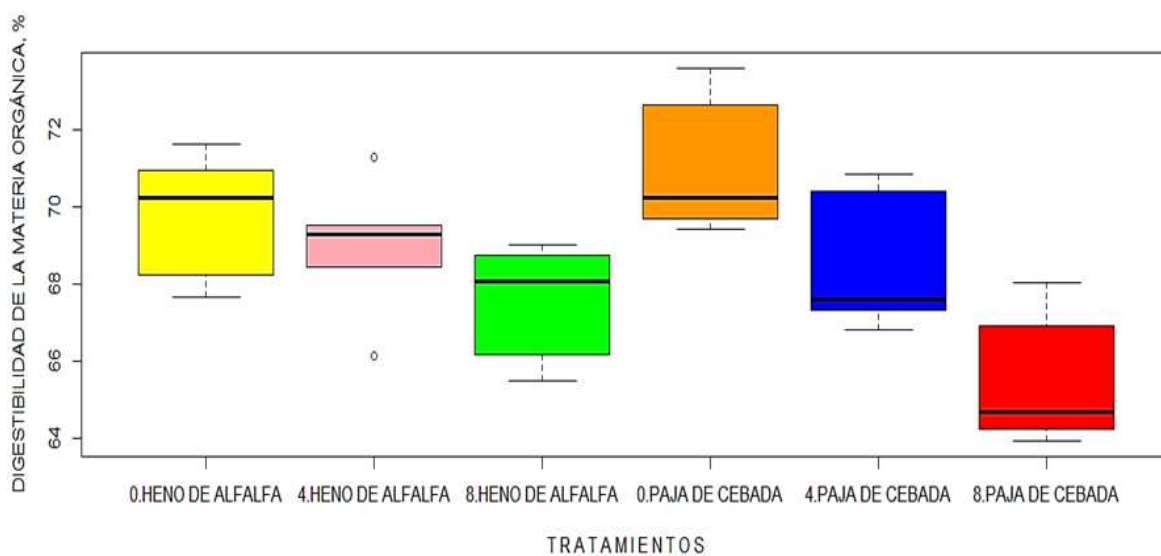


Figura 6. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la digestibilidad de la materia orgánica después de 48 horas de incubación *in vitro*

4.2 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO *IN VITRO*

Los resultados del volumen acumulado de gas *in vitro* a las 48 horas de fermentación en paja de cebada y heno de alfalfa incluyendo los diferentes niveles de taninos se muestran en la Tabla 7. Se puede apreciar que la producción de gas no fue afectada por la inclusión de taninos en sus diferentes niveles en ambos sustratos ($p > 0.05$). Estos resultados concuerdan con los reportados por Pamanés *et al.* (2021) quienes observaron que la producción de gas no varió significativamente por la inclusión creciente de taninos de hojas de *Curcubita foetidissima*. Wischer *et al.* (2013) igualmente confirmaron similar resultado, al evaluar distintos extractos tánicos para reducir la producción de metano sin alterar la producción de gas, siendo los extractos seleccionados con este efecto la semilla de uva, myrabolan, valonea y castaña. No obstante, existen diferencias significativas en los efectos principales del estudio. El análisis del efecto de inclusión de taninos muestra una reducción de la producción de gas cuando se incluyó el nivel más alto de taninos (8 por ciento) en comparación al control (0 por ciento) pero se obtuvo un valor similar al nivel medio de inclusión (4 por ciento) (Figura 7).

Tabla 7. Efecto del nivel de inclusión de taninos (g/100g MS) y tipo de sustrato sobre la producción total de gas a las 48 horas

		Producción de gas ml/g MS
Nivel	0	159.47 ^a ±20.42
	4	154.52 ^{ab} ±16.20
	8	145.32 ^b ±14.20
Sustrato	Paja de cebada	160.61 ^a ±14.50
	Heno de alfalfa	145.60 ^b ±17.69
Paja de cebada	0	171.41 ±12.68
	4	161.71 ±10.59
	8	148.72 ± 11.44
Heno de alfalfa	0	147.53 ±20.34
	4	147.34 ±18.48
	8	141.92 ±16.87
Probabilidad		
Nivel		0.0280
Sustrato		0.0053
Nivel*Sustrato		0.1746

^{a,b}: Medias con letras distintas en la misma columna son diferentes estadísticamente a la Prueba de Tukey (P<0.05)

Por otro lado, Pellikaan *et al.* (2011) indican que la adición del 10 por ciento de taninos de quebracho redujo la producción de gas mientras que los otros taninos como la de semilla de uva (100g/kg de alfalfa) no afectaron dicha producción. Esto puede atribuirse según lo referido por Ushlu *et al.* (2018), que los taninos reducen la producción de gas al formar un complejo-macromolecula que reduce la actividad microbiana inhibiendo la actividad de la enzima fibrolítica de los microorganismos. Además, se observó que existe diferencia entre los valores obtenidos de la paja de cebada y heno de alfalfa. Aderao *et al.* (2018) mencionan que el gas se produce por la fermentación de carbohidratos disponibles que sirven como fuente de energía para los microorganismos, mientras que la proteína y los lípidos son poco fermentables, lo que podría explicar que la producción de gas en la paja de cebada fue mayor que en el de heno de alfalfa.

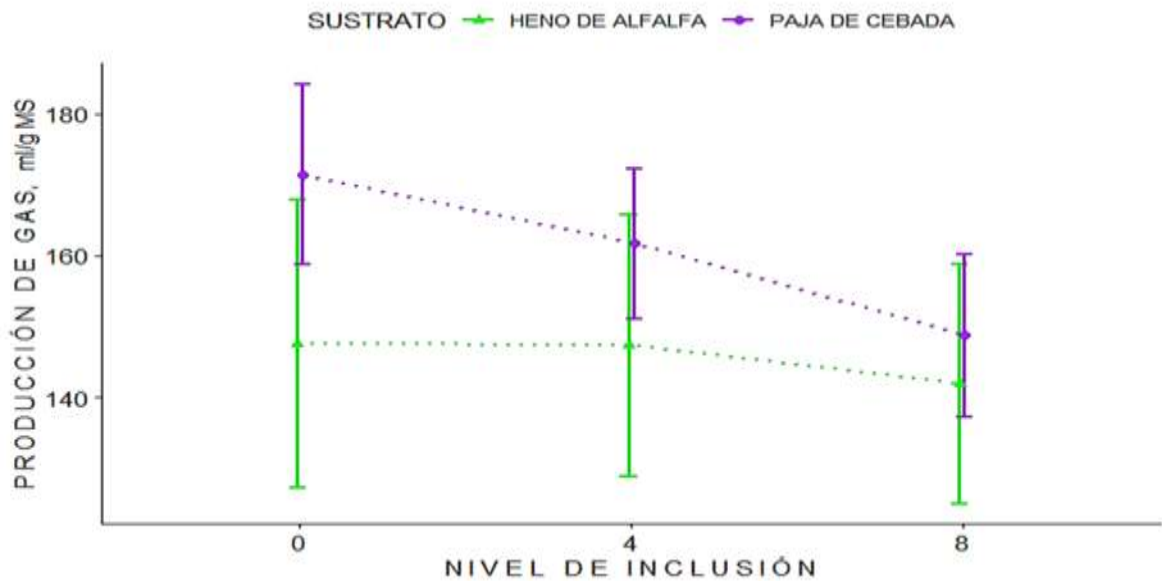


Figura 7. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la producción de gas después de 48 horas de incubación *in vitro*

En la Tabla 8 se muestran las concentraciones de metano producido por el efecto de los diferentes niveles de inclusión de taninos en los sustratos paja de cebada y heno de alfalfa. No se observó interacción entre el nivel de inclusión y el tipo de sustrato ($p = 0.13$), mientras que al analizar los efectos principales se observó diferencias en el nivel más alto de inclusión de taninos (8 por ciento) con respecto a los otros niveles (0 y 4 por ciento). No obstante, no se encontraron diferencias significativas por efecto del sustrato (Figura 8). El mismo efecto fue observado por Afzalani *et al.* (2022) que al incluir dosis creciente de taninos de hojas de Sengon (0, 2, 4 y 6 por ciento) durante 24 horas de fermentación redujeron la producción de metano de manera significativa aplicando dosis de 4 y 6 por ciento de tanino comparados con el control (0 por ciento). Adicionalmente, en otro estudio similar observaron una disminución de la producción de metano con la inclusión del 4 por ciento de taninos condensados e hidrolizables sobre una dieta basal (control) (Cappuci *et al.* 2020).

Tabla 8. Efecto del nivel de inclusión de tanino (g/100g MS) y tipo de sustrato sobre la producción de metano a las 24 horas

		Producción de metano ppm ¹
Nivel	0	72897.64 ^a ± 7298.31
	4	68962.79 ^a ± 7836.72
	8	61279.68 ^b ± 4601.73
Sustrato	Paja de cebada	65585.39 ± 8013.59
	Heno de alfalfa	69841.36 ± 7961.86
Paja de cebada	0	68372.93 ± 6324.55
	4	67592.76 ± 10589.69
	8	60790.47 ± 4944.55
Heno de alfalfa	0	77422.35 ± 5296.09
	4	70332.82 ± 4297.06
	8	61768.90 ± 4643.70
Probabilidad		
Nivel		0.0000
Sustrato		0.0504
Nivel*Sustrato		0.1253

^{a,b}: Medias con letras distintas en la misma columna son diferentes a la Prueba de Tukey (P<0.05)

¹: ppm: partes por millón

Estudios realizados por Wischer *et al.* (2013) y Pellikaan *et al.* (2011) utilizando taninos de semillas de uva encontraron una reducción de la producción de metano en 23 y 34 por ciento con la inclusión de 10 por ciento de taninos en ensilaje de pasto y heno de alfalfa, respectivamente. Según refieren Bueno *et al.* (2020) y Galindo-Blanco *et al.* (2018), que los taninos inhiben la metanogénesis a través de determinados mecanismos, así como una influencia directa sobre los microorganismos metanógenos, bacterias celulolíticas y protozoos, inhibiendo sus enzimas funcionales o reduciendo su población e indirectamente a través de la reducción de la digestibilidad de la fibra con una consecuente disminución de la producción de hidrógeno. Sin embargo, el efecto que tienen los taninos sobre la producción de metano depende mucho de su origen (Adejoro *et al.* 2019).

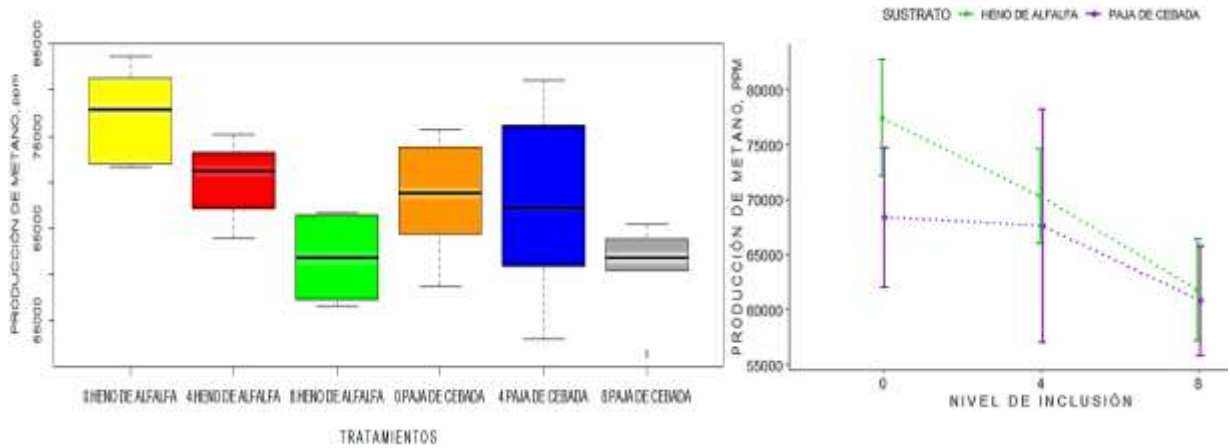


Figura 8. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la producción de metano después de 24 horas de incubación *in vitro*

4.3 DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO AMONICAL

Los valores de nitrógeno amoniacal (NH_3) se muestran en la Tabla 9, se observa que el patrón de concentración de amoníaco difirió significativamente ($p < 0.05$) entre tratamientos, registrando un efecto significativo de la interacción sustrato*nivel. Al final de la fermentación, el contenido promedio de amoníaco de los tratamientos con paja de cebada con diferentes niveles de inclusión de taninos (0, 4 y 8 por ciento) se registraron valores similares entre sí, pero fueron significativamente menores ($p < 0.05$) a los tratamientos que contienen heno de alfalfa. Además, el tratamiento con 8 por ciento de taninos del heno de alfalfa fue significativamente diferente al resto de tratamientos ($p < 0.05$) (Figura 9).

Algunos estudios revelan resultados similares y diferentes a los obtenidos en el presente estudio, porque los taninos utilizados en sus trabajos aumentan o disminuyen la concentración de amoníaco. Los resultados de este estudio están de acuerdo con los reportados por varios investigadores, quienes observaron que la inclusión de taninos disminuye de manera significativa las concentraciones de nitrógeno amoniacal (Cappucci *et al.* 2021, Cantet *et al.* 2019 y Mannelli *et al.* 2018). Cabe mencionar que la reducción de nitrógeno amoniacal se observó a partir de la inclusión de alta dosis de taninos (8 por ciento) pero no mostraron efecto alguno al adicionar dosis menores (4 por ciento) con respecto al control (T6 y T5 vs T4, $p < 0.05$), lo que puede atribuirse a la propia estructura y

concentración de los taninos, madurez y etapa fenológica en la que se encuentran los taninos en los vegetales el cual afecta su bioactividad (Pereira *et al.* 2018).

Tabla 9. Efecto del nivel de inclusión de tanino (g/100g MS) y tipo de sustrato sobre la concentración de nitrógeno amoniacal a las 48 horas

		Nitrógeno amoniacal μmol/ml
Nivel	0	23.27 ± 5.71
	4	22.44 ± 4.99
	8	20.97 ± 4.23
Sustrato	Paja de cebada	17.61 ± 0.98
	Heno de alfalfa	26.84 ± 2.15
Paja de cebada	0	17.99 ^c ± 1.12
	4	17.75 ^c ± 0.75
	8	17.08 ^c ± 0.95
Heno de alfalfa	0	28.54 ^a ± 1.97
	4	27.12 ^a ± 1.23
	8	24.86 ^b ± 1.45
Probabilidad		
Nivel		0.0001
Sustrato		0.0000
Nivel*Sustrato		0.0123

^{a,b,c}: Medias con letras distintas en la misma columna son diferentes a la Prueba de Tukey (P<0.05)

Por otro lado, la concentración de nitrógeno amoniacal está influenciada por el contenido de proteínas y aminoácidos del alimento (Afzalani *et al.* 2022). La formación de complejos tanino-proteína está atribuida a la presencia de gran cantidad de grupos hidroxilo el cual genera una disminución de los valores de amoniacal. La composición y estructura de estos complejos tendrán un impacto positivo en el aumento en el flujo de proteínas al intestino delgado debido que las proteínas no pueden separarse de estos enlaces a un pH neutro (rumen), sin embargo, a un pH ácido (abomaso) algunos de los enlaces tanino-proteína se dividen y, en consecuencia, las proteínas son digeridas y pueden descomponerse en aminoácidos y absorbidos en el intestino delgado (Min *et al.* 2006). Además, los taninos pueden reducir la concentración de amoniacal al inhibir el crecimiento de bacterias proteolíticas (Patra y Saxena 2010). De lo contrario, la reducción del amoniacal puede ser causada por la desactivación de las enzimas proteolíticas (Makkar 2003). No obstante, los datos obtenidos en la presente investigación no revelan si la reducción en la concentración de nitrógeno amoniacal se debe al efecto inhibitorio de las bacterias proteolíticas o a la

propiedad de los taninos para formar un compuesto complejo con las proteínas, el cual impide su degradación y utilización por los microorganismos.

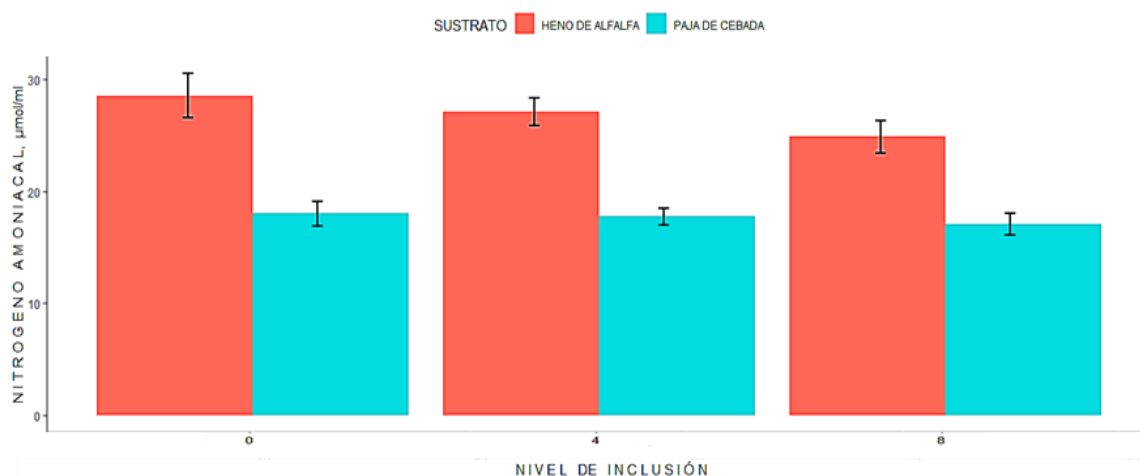


Figura 9. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la concentración del nitrógeno amoniacal después de 48 horas de incubación *in vitro*

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MOLAR DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

En cuanto a la concentración molar de ácidos grasos volátiles (AGV) no se observó efecto significativo en la interacción sustrato*nivel de inclusión de taninos en ninguno de los porcentajes de AGV (acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico) (Figura 10). No obstante, al evaluar los efectos principales, se ha observado que el factor sustrato afectó significativamente la proporción molar de cada AGV, excepto sobre el ácido acético y butírico (Tabla 10). Esto es consistente con los hallazgos de varios investigadores, quienes indican que los taninos no producen disminución significativa de las concentraciones de AGV, a pesar de que su inclusión afecte la degradabilidad de la materia orgánica y de fibra detergente neutro (Muñoz-Cuautle *et al.* 2022, Piñeiro-Vásquez *et al.* 2018 y Bhatta *et al.* 2014).

Sin embargo, la concentración de AGV puede variar por el factor sustrato el cual puede atribuirse al sustrato utilizado (sustratos) probablemente por una alteración de la población microbiana, tal como lo señala Belanche *et al.* (2012) quienes en su estudio observaron la variación de la estructura microbiana del rumen debido al tipo de carbohidratos (ricas en

fibra o de almidón) y el nivel de proteína ingerido por el rumiante. Es decir, la diferencia encontrada en la concentración de AGV se da en respuesta al tipo de sustrato utilizado el cual selecciona a los grupos de microorganismos que van a participar en la fermentación y estos grupos seleccionados son afectados por los taninos de diferente manera. En el presente estudio los sustratos utilizados difieren en contenido de proteína (5.05 y 15.68 por ciento para paja de cebada y heno de alfalfa, respectivamente) y fibra detergente neutro (50.27 y 44.75 por ciento para paja de cebada y heno de alfalfa, respectivamente).

En contraste con otros estudios similares, la suplementación con 10 por ciento de taninos de semilla de uva sobre el ensilado de pasto afectó de manera significativa la concentración molar de AGV, con excepción del propiónico que fue semejante al tratamiento control (Wischer *et al.* 2013). Asimismo, observaron un incremento de la concentración del ácido acético en un 22 por ciento en relación al control, este resultado puede deberse a otras sustancias fermentables como la degradación de los taninos hidrolizables (McSweeney *et al.* 2001). Los taninos hidrolizables pueden llegar a convertirse en ácido gálico y posteriormente en ácido acético y butírico producto de la degradación realizada por los microorganismos del rumen (Waghorn 2008). Sin embargo, la concentración molar de ácido acético en el presente estudio fueron similares en todos los tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 10. Efecto del nivel de inclusión de tanino (g/100g MS) y tipo de sustrato sobre la concentración molar de ácidos grasos volátiles a las 48 horas

		Ácidos grasos volátiles					
		mM ¹					
		Ac. acético	Ac. propiónico	Ac. Isobutírico	Ac. butírico	Ac. isovalérico	Ac. valérico
Nivel	0	39.19±4.73	12.58 ± 2.13	1.02 ±0.20	4.71 ±0.73	1.36 ±0.45	0.84 ±0.14
	4	38.33±4.06	12.01 ± 2.17	0.95 ±0.16	4.37 ±0.64	1.24 ±0.36	0.77 ±0.09
	8	38.67 ±6.43	11.60 ± 1.76	0.96 ±0.23	4.21 ±0.89	1.22 ±0.49	0.75 ±0.15
Sustrato	Paja de cebada	39.02 ±4.38	13.33 ^a ± 1.61	0.83 ^a ±0.09	4.68 ±0.59	0.94 ^a ±0.17	0.72 ^a ±0.08
	Heno de alfalfa	38.44 ±5.66	10.80 ^b ± 1.45	1.11 ^b ±0.17	4.18 ±0.84	1.60 ^b ±0.32	0.86 ^b ±0.14
Paja de cebada	0	40.94±3.77	14.20 ± 1.23	0.88 ±0.10	5.01 ±0.46	1.02 ±0.18	0.76 ±0.08
	4	40.01 ±2.20	13.77 ± 0.67	0.83 ±0.08	4.81 ±0.20	0.96 ±0.15	0.72 ±0.05
	8	36.10 ±5.80	12.02 ± 1.99	0.80 ±0.09	4.21 ±0.75	0.86 ±0.19	0.67 ±0.08
Heno de alfalfa	0	37.44 ±5.46	10.96 ± 1.42	1.16 ±0.19	4.41 ±0.87	1.70 ±0.35	0.93 ±0.15
	4	36.65 ±5.12	10.24 ± 1.51	1.06 ±0.12	3.93 ±0.64	1.53 ±0.24	0.82 ±0.11
	8	41.23 ±6.74	11.19 ± 1.67	1.11 ±0.22	4.21 ±1.13	1.58 ±0.41	0.83 ±0.17
		Probabilidad					
Nivel		0.8353	0.1936	0.3890	0.1760	0.2970	0.1221
Sustrato		0.7765	0.0004	0.0000	0.1060	0.0000	0.0057
Nivel*Sustrato		0.0956	0.1114	0.8050	0.4040	0.8710	0.9647

^{a,b}: Medias con letras distintas en la misma columna son diferentes a la Prueba de Tukey (P<0.05)

¹: mM: milimolar

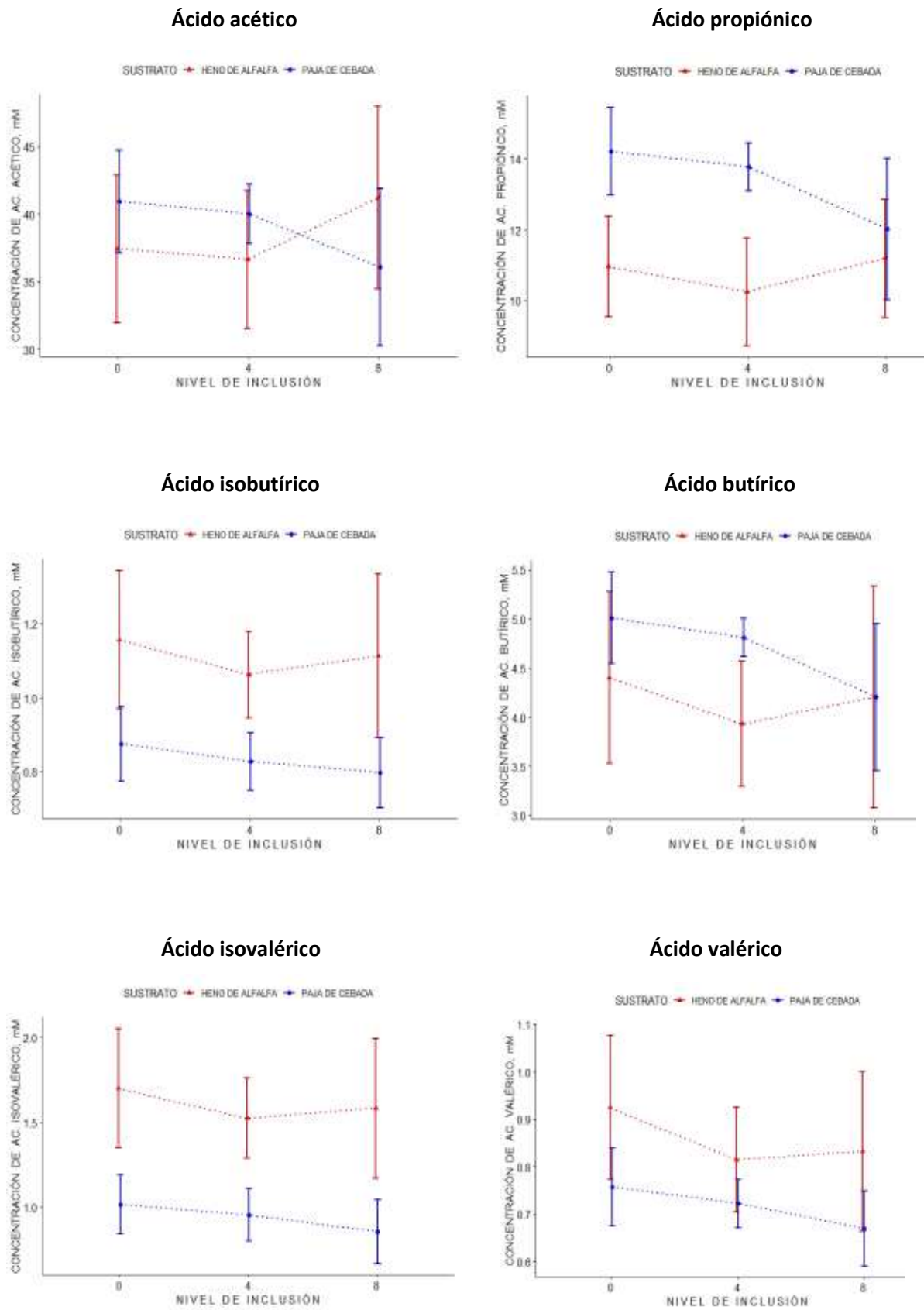


Figura 10. Efecto de la interacción entre el nivel de inclusión y tipo de sustrato en la concentración de ácidos grasos volátiles después de 48 horas de incubación *in vitro*

La presente investigación sugiere que la inclusión de taninos de semilla de uva tiene un efecto selectivo y directo sobre los microorganismos metanogénicos e indirectos al formar complejos con varios tipos de moléculas como proteínas, polisacáridos y minerales, por lo que dificultaría la degradación por la microbiota ruminal (Smith *et al.* 2005). La formación de este complejo podría ser el causante de la disminución de la digestibilidad de la materia orgánica, el cual a su vez, tendría un impacto en la producción de metano al inhibir el suministro de hidrogeno (donados por el acetato y butirato) (Bueno *et al.* 2020). Además, de que se produce una reducción en los valores de amoniaco (Cantet *et al.* 2019). Por otra parte, se esperaba que la disminución en el valor de la digestibilidad de la materia orgánica conllevaría a la disminución en la concentración molar de los AGV.

Sin embargo, en el presente estudio no se observó este efecto con la adición de taninos de semilla de uva, lo que representaría una elección interesante en la alimentación de rumiantes lecheros, debido que la concentración de ácido acético y butírico (fuente de energía y precursores de grasa en la leche) no variaron significativamente por este compuesto, como fueron reportados en otros estudios (Beauchemin *et al.* 2007). Sumado a esto, el flujo de aminoácidos que ingresan al intestino delgado por la disminución de amoniaco favorecería la ganancia de peso y la producción de leche (Min *et al.* 2006).

No obstante, es difícil comparar los resultados del presente estudio con otros, ya que los taninos ejercen efectos variables no solamente por el nivel de inclusión sino también dependen del tipo de tanino (condensado o hidrolizable), origen vegetal, peso molecular, procedimiento de extracción y purificación (Mueller-Harvey *et al.* 2019), así como también de las condiciones de incubación *in vitro*, el sustrato basal utilizado y tiempo de incubación (Guerreiro *et al.* 2021).

Al respecto, se conoce que tanto los taninos condensados como los hidrolizables tienen la capacidad de disminuir la producción de metano entérico, sin embargo, los taninos condensados de quebracho son más efectivos para reducir la producción de metano que los taninos hidrolizables de castaño sin cambios en las poblaciones de arqueas y protozoos (Battelli *et al.* 2023). No obstante, Costa *et al.* (2018) observaron un crecimiento reducido de bacterias celulolíticas con la adición de taninos condensados de mimosa en comparación con taninos hidrolizables de castaño.

En cuanto a los otros parámetros de fermentación, se redujo linealmente la concentración de amoníaco tanto con la adición de taninos condensados de quebrancho como con los taninos hidrolizables de castaño (Battelli *et al.* 2023). Por otro lado, se observaron concentraciones más bajas de ácidos grasos volátiles en el rumen con la inclusión de taninos condensados de mimosa en contraste a los taninos hidrolizables de castaño (Costa *et al.* 2018).

V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que:

1. El efecto de la interacción entre tipo de sustrato y nivel de inclusión de taninos, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la digestibilidad de la materia orgánica con la inclusión del 8 por ciento de taninos de semilla de uva en paja de cebada, la digestibilidad de la materia orgánica se redujo.
2. Se encontró interacción significativa ($p < 0.05$) entre los factores nivel de inclusión y tipo de sustrato sobre la concentración de nitrógeno amoniacal con el uso de 8 por ciento de taninos de semilla de uva en heno de alfalfa, la concentración de nitrógeno amoniacal disminuyó.
3. No se observó interacción significativa entre los factores nivel de inclusión y tipo de sustrato sobre la producción de metano, de gas y de ácidos grasos volátiles.
4. El uso de 8 por ciento de taninos de semilla de uva en los sustratos paja de cebada y heno de alfalfa redujo significativa ($p < 0.05$) la producción de gas y metano *in vitro*.
5. La concentración molar del ácido propiónico, isobutírico, isovalérico y valérico fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) debido al factor sustrato. La concentración del ácido propiónico fue mayor ($p < 0.05$) en la paja de cebada, en cambio, la concentración del ácido isobutírico, isovalérico y valérico fueron mayores ($p < 0.05$) en el heno de alfalfa.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar mayor investigación sobre inclusión de extracto de taninos de semilla de uva en 8 por ciento o más para medir su efecto sobre la degradabilidad *in situ* y la digestibilidad *in vivo* de un alimento o sustrato.
2. Se recomienda realizar estudios para dilucidar el impacto de los taninos de semilla de uva en la población ruminal y el metabolismo de los nutrientes a nivel ruminal para el uso adecuado del extracto como aditivo alimentario.
3. Se recomienda evaluar otros parámetros de fermentación como la concentración de CO₂, pH, digestibilidad de la fibra detergente neutro y síntesis de la biomasa microbiana para tener una mejor comprensión sobre los efectos de los taninos de semilla de uva.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboagye, I.A.; Beauchemin, K.A. 2019. Potential of Molecular Weight and Structure of Tannins to Reduce Methane Emissions from Ruminants: A Review. *Animals* 2019, 9, 856. <https://doi.org/10.3390/ani9110856>
- Adejoro, F. A; Hassen, A; Akanmu, A. M. 2019. Effect of lipid-encapsulated acacia tannin extract on feed intake, nutrient digestibility and methane emission in sheep. *Animals*, 9(11), pp. 863. <https://doi.org/10.3390/ani9110863>
- Aderao, G.N; Sahoo, A; Bhatt, R.S; Kumawat, P.K; Soni, L. 2018. *In vitro* rumen fermentation kinetics, metabolite production, methane and substrate degradability of polyphenol rich plant leaves and their component complete feed blocks. *Journal of Animal Science and Technology*; 60:26. <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0184-6>
- Afzalani, A; Muthalib, R.A; Raguati, R; Syahputri, E; Suhaza, L; Musnandar, E. 2022. Supplemental effect of condensed tannins from sengon leaves (*albizia falcataria*) on *in vitro* gas and methane production. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 32(6): 2022, Page: 1513-1520. Disponible en: <https://doi.org/10.36899/JAPS.2022.6.0559>
- AOAC. (Assotiation of Official Analytical Chemists). 2005. Official methods of analysis. 18th edition. Washington D.C. 125 p.
- Araiza-Ponce, K; Murillo-Ortiz, M; Herrera-Torres, E; Valencia-Vázquez, R; Carrete-Carreón, F; Pámanes-Carrasco, G. 2020. *Leucaena leucocephala* y *Opuntia ficus-indica* reducen la producción de metano *in vitro*. *Abanico Veterinario* 10:1-13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.18>
- Barry, R. G. y Chorley, R. J. 2003. *Atmosphere, Weather, and Climate*, Routledge Taylor & Francis Group, New York.
- Battelli M; Colombini S; Parma, P; Galassi, G; Crovetto, G.M; Spanghero, M; Pravettoni, D; Zanzani, S.A; Manfredi, M.T; Rapetti, L. 2023. *In vitro* effects of different levels of quebracho and chestnut tannins on rumen methane production, fermentation parameters, and microbiota. *Frontiers in Veterinary Science* 2023 Apr

18;10:1178288. doi: 10.3389/fvets.2023.1178288. PMID: 37152691; PMCID: PMC10154982.

- Beauchemin, K.A; McGinn, S.M; Petit, H.B. 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science* 87: 431-440.
- Belanche, A; Doreau, M; Edwards, J.E; Moorby, J.M; Pinloche, E; Newbold, C.J. 2012. Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. *The Journal of Nutrition* 142, 1684–1692. <https://doi.org/10.3945/jn.112.159574>.
- Benavides, H.O. y León, G.E. 2007. Información técnica sobre gases de efecto invernadero y el cambio climático. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM. Colombia.
- Bernaouda, M; González, R; Molina, L; Castelan, O. 2017. Estado de la investigación sobre emisiones de metano entérico estrategias de mitigación en América Latina. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.8 Núm.4*. p. 965-974
- Berra, G. y Finster, L. 2002. Emisión de gases de efecto invernadero; la influencia de la ganadería argentina. *Cadena de la Carne Vacuna, Tecnologías para nuevos escenarios*, IDIA 21 (2). p. 212-215.
- Bhatta, R.; Uyeno, Y.; Tajima, K.; Takenaka, A.; Yabumoto, Y.; Nonaka, I.; Enishi, O.; Kurihara, M. 2009. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science* 2009; 92:5512–5522.
- Bhatta, R; Saravanan, M; Baruah, L; Prasad, C.S. 2014. Effects of graded levels of tannin containing tropical tree leaves on *in vitro* rumen fermentation, total protozoa and methane production. *Journal of Applied Microbiology* 118: 557-564.
- Blouin, J. y Guimberteau G. 2004. *Maduración y Madurez de la Uva*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-España.
- Bodas, R; Prieto, N.; García-González, R.; Andrés, S; Giráldez, F.J; López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176:78– 93.
- Bueno, I.C.S; Brandi, R.A; Fagundes, G.M; Benetel, G; Muir, J.P. 2020. The role of condensed tannins in the *in vitro* rumen fermentation kinetics in ruminant species: feeding type involved. *Animal*. 10 (635): 1-11.

- Cantet, J.M; Neumann, A.M; Colombatto, D; Wawrzkievicz, M; Jaurena, G. 2019. Efecto de taninos condensados en el potencial metanogénico y eficiencia de digestión *in vitro* de raigrás. Revista argentina de producción animal vol 38 n° 2: 37-47
- Cappucci, A; Mantino, A; Buccioni, A; Casarosa, L; Conte, G; Serra, A; Mannelli, F; Luciano, G; Foggi, G; Mele, M. 2021. Diets supplemented with condensed and hydrolysable tannins affected rumen fatty acid profile and plasmalogen lipids, ammonia and methane production in an *in vitro* study, Italian Journal of Animal Science, 20:1, 935-946. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1915189>
- Cardona, J. L; Mahecha, L; Angulo, J. 2017. Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos. Agronomía Mesoamericana, vol. 28, núm. 1. Universidad de Costa Rica.
- Carmona, J; Bolívar, D; Giraldo, L. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. Revista Colombiana de Ciencias Pecurias, v.18, n.1, p.49-63.
- Chaney, A.L. y Marbach, E.P. 1962. Modified reagent for determination of Urea and Ammonia. Clinical Chemistry. 8(2): 130-132.
- Costa, M; Alves, S.P; Cappucci, A; Cook, S.R; Duarte, A; Caldeira, R.M; McAllister, T.A; Bessa, R.J.B. 2018. Effects of condensed and hydrolyzable tannins on rumen metabolism with emphasis on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66:3367–3377.
- Duba, K. Y Fiori, L. 2015. Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. The Journal of Supercritical Fluids, 98, 33-43.
- Durmic, Z. and Blache, D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. Animal Feed Science and Technology, 176: 150-162.
- Ferreira, R.; Sellés, G; Valenzuela, J. 2002. Para modificar cualidades del vino. Tierra adentro 42:13-15.
- Galindo-Blanco, J. L; Rodríguez-García, I; González-Ibarra, N; García-López, R; Herrera-Villafranca, M. 2018. Sistema silvopastoril con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray: efecto en la población microbiana ruminal de vacas. Pastos y Forrajes. 41 (4):273-280. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v41n4/pyf06418.pdf>, 2018.
- Goering, H. y Van Soest, P. 1970. Análisis de Fibra de Forrajes. Universidad Nacional Agraria La Molina. Programa de Forrajes. Traducción de “Forage fiber analyses” Misión agrícola de la Universidad de Carolina del Norte- USAID. Lima- Perú.

- Gomaa, R.M; González-Ronquillo, M; Arredondo-Ramos, J; Molina, L.T; Castelán-Ortega, O.A. 2017. Effect of tanniferous plants on *in vitro* digestion and methane production. Tanniferous plants and methane production Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 4(11):371-380,2017. Disponible en: DOI: 10.19136/era.a4n11.1160
- Guerreiro, O; Alves, S.P; Costa, M; Duarte, M.F; Jerónimo, E; Bessa, R.J.B. 2021. Effects of Increasing Doses of Condensed Tannins Extract from *Cistus Ladanifer* L. on *in vitro* ruminal fermentation and biohydrogenation. *Animals* 2021, 11, 761. <https://doi.org/10.3390/ani11030761>
https://infocarbono.minam.gob.pe/wpcontent/uploads/2021/06/INGEI_2016_Junio-2021_Final.pdf
- INEI. (Instituto Nacional de Estadística). 2017. Producción de uva y pisco, estadísticas. <http://webapp.inei.gob.pe:8080/sirtod-series/> visto 9.05.18
- Kariuki, I.W. y Norton, B.W. 2008. La digestión de la proteína de la dieta unida por taninos condensados en el tracto gastrointestinal de las ovejas. *Animal Feed Science and Technology*. 142: 197 - 209. doi: 10.1016 / j. anifeedsci.2007.08.006 [Ver artículo] [Web of Science]
- Kim, B.H. and Gadd, G.M. 2008. *Bacterial physiology and metabolism*. 1a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kondo, M; Hirano, Y; Kita, K; Jayanegara, A; Yokota, H.O. 2014. Fermentation characteristics, tannin contents and *in vitro* ruminal degradation of green tea and black tea byproducts ensiled at different temperatures. *Asian Australas. Journal of Animal Science* 27 (7): 937-945.
- Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, 1:9. pp 1371–1391.
- Makkar, H. P. S; Bluemmel, M; Borowy, N. K; and Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61(2): 161–165
- Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* 49: 241–256.
- Mannelli, F; Cappucci, A; Pini, F; Pastorelli, R; Decorosi, F; Giovannetti, L; Mele, M; Minieri, S; Conte, G; Pauselli, M. 2018. Effect of different types of olive oil

- pomace dietary supplementation on the rumen microbial community profile in Comisana ewes. *Scientific Reports* 8:8455.
- Marín, G. 2013. Estimación del inventario de emisiones de metano entérico de ganado lechero en el departamento de Antioquia, Colombia. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Medellín-Colombia.
- Mauricio, R. M; Mould, F. L; Dhanoa, M. S; Owen, E; Channa, K. S. and Theodorou, M. K. 1999. Asemi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology* 79:321–330.
- Mazza, G. 1999. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(4): 341-371.
- McSweeney, C.S; Palmer, B; McNeill, D.M; Krause, D.O. 2001. Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91: 83-93.
- MIDAGRI. 2020. Dictamen de expertos 2020. Informe de consultoría. Consultor nacional en ASOUT bajo la Iniciativa para la Transparencia en la Acción Climática (ICAT).
- Min, B.R; Pinchak, W.E; Anderson, R.C; Fulford, J.D; Puchala, R. 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and *in vitro* and *in vivo* bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of Animal Science* 84, 2546–2554.
- MINAM. Ministerio del Ambiente. 2021. Inventario nacional de gases de efecto invernadero del año 2016 y actualización de las estimaciones de los años 2000, 2005, 2010, 2012 y 2014 (INGEI 2016). Lima: Dirección General de Cambio Climático y Desertificación.
- MINAM. Ministerio del Ambiente. 2021. Reporte anual de gases de efecto invernadero del sector desechos del 2016 (RAGEI 2016). Categoría: Eliminación de desecho sólido e incineración abierta de desecho. Disponible en:
- Ministerio de la producción. 2014. Principales productos que participan en la muestra del Índice de Crecimiento Industrial 2001-12.
- Mueller-Harvey, B; Dohme-Meier, G; Hoste, F; Karonen, H; K€olliker, M; Lüscher, R; Niderkorn, A; Pellikaan, V. 2019. Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: importance of structure, concentration, and diet composition. *Crop Science* 2019;59:1e25.

- Muñoz-Cuautle, A; Ortega-Cerrilla, M.E; Herrera-Haro, J.G; Ramírez-Bribiesca, J.E; Zetina-Córdoba, P. 2022. Fermentación ruminal y producción de metano *in vitro* de dietas para ovinos con inclusión de taninos condensados y niveles crecientes de aceite de orégano (*lippia graveolens*). Tropical and Subtropical Agroecosystems 25 (2022): #081. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/361820902>
- NOAA. (National Oceanic and Atmospheric Administration). 2020. Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. National Oceanic and Atmospheric Administration, USA: Global Greenhouse Gas Reference Network. Available at: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/gl.trend.html>.
- NOAA. (National Oceanic and Atmospheric Administration). 2022. Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. Global Monitoring Laboratory. <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html>
- OMM. (Organización Meteorológica Mundial). 2022. Boletín de la OMM sobre los gases de efecto invernadero. Datos sobre gases de efecto invernadero (CMDGEI) del servicio meteorológico del Japón. <https://public.wmo.int/es/eventos/meetings>
- Pámanes-Carrasco, G; Murillo-Ortiz, M; Reyes-Jáquez, D; Valencia, R; Herrera-Torres, E. 2020. Reducción en la producción ruminal de metano *in vitro* con la inclusión de *Cucurbita foetidissima*. Revista MVZ Córdoba. 2021; 26(1):e1941. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1941>
- Patra, A. y Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry, 71:1198–1222.
- Patra, A. y Saxena, J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91: 24–37.
- Pellikaan, W. F; Hendriks, W. H; Uwimana, G; Bongers, J. G. M; Becker, P.M; Cone, J. W. 2011. A novel method to determine simultaneously methane production during *in vitro* gas production using fully automated equipment. Animal Feed Science and Technology. 2011. 168: 196–205.
- Pereira, T. P; Modesto, E. C; Nepomuceno, D. D; De Oliveira, O. F; De Freitas, R. S. X; Muir, J. P; Dubeux Jr, J. C. B; Almeida, J. C. de C. 2018. Characterization and biological activity of condensed tannins from tropical forage legumes. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 53(9), pp. 1070–1077. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018000900011>

- Piluzza, G; Sulas, L; Bullitta, S. 2013. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science*. 2013. 69: 32-48.
- Piñeiro-Vázquez, A.T; Canul-Solis, J.R; Jiménez- Ferrer, G.O; Alayón-Gamboa, J.A; Chay-Canul, A.J; Ayala-Burgos, A.J; Aguilar-Pérez, C.F; Ku-Vera, J.C. 2018. Effect of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* on rumen fermentation, methane production and population of rumen protozoa in heifers fed low quality forage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 31(11):1738-1746.
- Primavesi, O; Frighetto, R. T; Pedreira, M. D. S; De Lima, M. A; Berchielli, T. T. and Barbosa, P. F. 2004. Dairy cattle enteric methane measured in Brazilian tropical conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39 (3): 227-283.
- Qiao, J; Zhiliang, T; Wang, M. 2014. Potential and existing mechanisms of enteric methane production in ruminants. *Scientia Agricola* 71: 345-355.
- Ramirez, J.E. 2018. Eventos químicos-fisiológicos del metano en los rumiantes. *Agro Productividad*, 11(2) pp: 22-33.
- Ramirez, J.F; Posada, O.S; Noguera, R. 2014. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2014; Vol 9(2): 307-323.
- Ramos, R.J. 2015. Estudio de pre factibilidad para el desarrollo industrial de productos alternativos en base a subproductos derivados de la industria vitivinícola en la región de Ica. Tesis para optar el título de ingeniero industrial. Pontificia universidad católica del Perú.
- Relling, A. E. y Mattioli, G. A. 2008. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Corresponde a una actualización de los autores del libro "fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes" De Editorial EDULP (Ediciones 2002 y 2003) Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP.
- Restrepo, A; Rodríguez, E; Manjarrés, K. 2011. Cortezas de naranja comestibles: una aproximación al desarrollo de productos con valor agregado a partir de residuos agroindustriales. *Producción + limpia*, 6(2):47-57.
- Rouquié, C; Dahdouh, L; Delalonde, M; Wisniewaki, C. 2017. An innovative lab-scale strategy for the evaluation of Grape Processing Residues (GPR) filterability: Application to GPR valorization by ultrafiltration. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*.

- Smith, A.H; Zoetendal, E; Mackie, R.I. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology* 2005, 50, 197–205.
- Steinfeld, H; Pierre, G; Tom, W; Vincent, C; Rosales, M; Haan, C. 2009. La larga sombra del ganado. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. Informe técnico. 87-139.
- Surco, L.F; Ayquipa, P.H; Quispe, G.W; García C.J; Valle C.M. 2020. Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante de extracto de semillas de uvas residuos de la producción de Piscos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional San Luis Gonzaga - Ica. *Revista de la Sociedad Química del Perú* vol.86 n°.2 Lima abr./jun 2020. <http://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v86i2.282>
- Tan, Y; Sieo, C; Abdullah, N; Liang, J; Huang, X; Ho, Y. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 169:185-193.
- Terranova, M; Kreuzer, M; Braun, U; Schwarm, A. 2018. *In vitro* screening of temperate climate forages from a variety of woody plants for their potential to mitigate ruminal methane and ammonia formation. *The Journal of Agricultural Science* 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0021859618000989>
- Tiemann TT, Avila P, Ramírez G, Lascano C, Kreuzer M, Hess H. 2008. *In vitro* ruminal fermentation of tanniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Animal Feed Science and Technology* 146: 222-241. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.12.009>
- Tiemann, T; Franco, L; Plazas, C; Avila, P; Ramirez, G; Hess, H; Lascano, C. 2006. Efecto de localidad y nivel de fertilización en la producción de biomasa de leguminosas arbustivas. ETH Zurich, Instituto de Producción Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza.
- Ushlu, O.S; Kurt, O; Kaya, E; Kamalak, A. 2018. Effect of species on chemical composition, metabolizable energy, organic matter digestibility and methane production of some legume plants grown in Turkey. *Journal of Applied Animal Research* 46 (1); 1158-1161.
- Van Soest, P. J; Robertson, J. B; Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74:3583–3597.

- Vargas, E; Cárdenas, M; Pabón, Y; Carulla, J. 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. Grup.Invest. Nutrición Animal. Dpto Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional De Colombia. Bogotá.
- Vargas, P. A. 2006. Métodos de extracción y caracterización de taninos condensados, utilizados en CIAT, ventajas y desventajas. En: “Memorias del Segundo Taller Taninos en la Nutrición de Rumiantes
- Vasta, V; Daglio, M; Cappucci, A; Buccioni, A; Serra, A; Viti, C; Mele, M. 2019. Invited review: plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: experimental evidence and methodological approaches. *Journal of Dairy Science* 102:3781–3804.
- Veizaga, A. 2012. Inventario de gases de efecto invernadero emitidos por la actividad agropecuaria boliviana Inventory of greenhouse gas emissions by Bolivian agriculture, 2(3), 351–370.
- Vélez, O.M; Campos, R; Sánchez, H; Giraldo, L.A. 2017. Evaluación de diferentes niveles de inclusión de plantas nativas de sabanas inundables sobre una dieta basal de *Brachiaria humidicola* y su efecto sobre la producción de metano *in vitro*. *Archivos de Zootecnia*, vol. 66, núm. 255, 2017, pp. 343-352 Universidad de Córdoba Córdoba, España
- Waghorn, G.C. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 2008. 147: 116–139.
- Waghorn, G.C; Reed, J.D; Ndlovu, L.R. 1997. Condensed Tannins and Herbivore Nutrition. In *International Grassland Congress ed. Proceedings XVIII IGC*. Winnepeg, Manitoba. pp. 153-166.
- Wischer, G.; Boguhn, J.; Steingäß, H.; Schollenberger M. and Rodehutsord M. 2013. Effects of different tannin-rich extracts and rapeseed tannin monomers on methane formation and microbial protein synthesis *in vitro*. *Institut fur Tierernahrung, Universitat Hohenheim, Germany. Animal* (2013), 7:11, pp 1796–1805
- Yuliana, P; Laconi, E.B; Wina, E; Jayanegara, A. 2014. Extraction of tannins and saponins from plant sources and their effects *in vitro* methanogenesis and rumen fermentation. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* 39 (2): 91-97.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de fenoles y preparación del medio de digestión



Figura 11. Dilución de los taninos de semilla de uva en agua des ionizada para la cuantificación de fenoles



Figura 12. Ovino Corridale ruminalmente fistulado para la obtención del líquido ruminal



Figura 13. Filtrado del líquido ruminal a través de cuatro capas de gasa para la preparación del inóculo

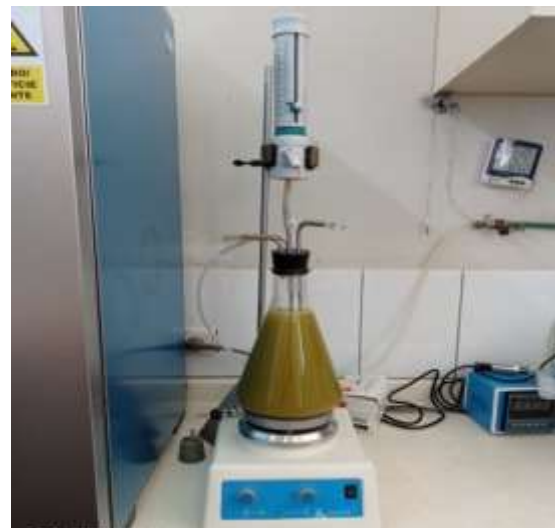


Figura 14. Preparación del inóculo mediante el mezclado del líquido ruminal, saliva artificial y solución reductora

Anexo 2. Incubación y determinación de la digestibilidad de la materia orgánica



Figura 15. Pesado del sustrato y los taninos en las botellas de incubación



Figura 16. Incubación de los tratamientos experimentales para la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica



Figura 17. Análisis de cenizas para la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica



Figura 18. Incubación de los tratamientos experimentales en baño maría para la determinación de la producción de gas y metano

Anexo 3. Determinación de la producción de gas, metano, nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles



Figura 19. Cuantificación de la producción de gas utilizando una válvula de 3 vías y un transductor de presiones

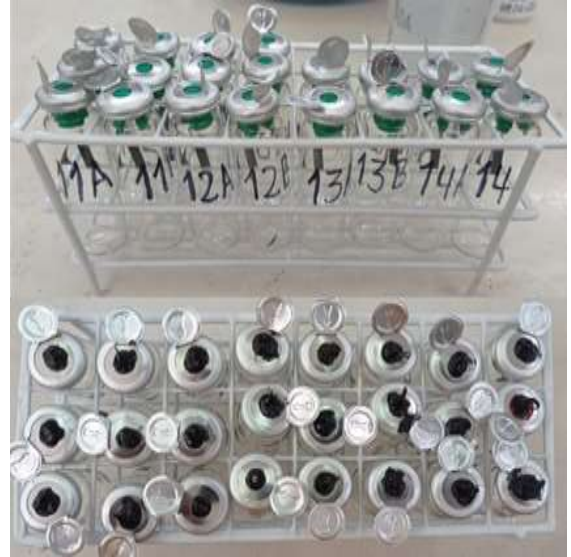


Figura 20. Sellado de los viales conteniendo las muestras de gas a las 24 horas de medición para su posterior cuantificación de metano



Figura 21. Filtrado de contenido ruminal en viales de polietileno después de las 48 horas de incubación



Figura 22. Congelación de los viales de polietileno conteniendo el filtrado líquido para su posterior determinación de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles

Anexo 4. Valores de digestibilidad de la materia orgánica y nitrógeno amoniacal

SUSTRATO	N° CORRIDA	¹ R	NIVEL DE INCLUSIÓN (porcentaje)	² DMO	³ NH ₃
				porcentaje	μmol/ml
PAJA DE CEBADA	1	1	0	69.69	17.08
		2	0	69.4	19.59
		3	0	72.64	19.08
		4	0	69.94	17.08
		5	0	70.51	18.08
		6	0	73.59	17.08
	2	1	4	67.51	18.58
		2	4	67.32	18.08
		3	4	70.4	18.58
		4	4	67.69	17.08
		5	4	66.81	17.08
		6	4	70.84	17.08
	1	1	8	64.54	17.08
		2	8	64.22	17.58
		3	8	68.01	18.58
		4	8	64.8	16.07
		5	8	63.92	16.07
		6	8	66.92	17.08
HENO DE ALFALFA	1	1	0	70.95	30.64
		2	0	70.26	30.13
		3	0	70.17	30.13
		4	0	68.22	26.12
		5	0	67.66	27.12
		6	0	71.62	27.12
	2	1	4	69.17	28.63
		2	4	69.36	28.63
		3	4	71.28	27.12
		4	4	66.13	26.12
		5	4	68.42	26.12
		6	4	69.51	26.12
1	1	8	68.24	24.61	
	2	8	67.88	26.62	
	3	8	68.99	26.62	
	4	8	66.17	23.1	
	5	8	65.49	24.11	
	6	8	68.72	24.11	

1= Repetición; 2= Digestibilidad de la materia orgánica; 3= Nitrógeno amoniacal

Anexo 5. Valores de producción de gas y metano

SUSTRATO	N° CORRIDA	¹ R	NIVEL DE INCLUSIÓN (porcentaje)	² PG	³ CH ₄	
				ml/g MS	ppm	
PAJA DE CEBADA	1	1	0	181.89	64368.704	
		2	0	183.64	70731.022	
		3	0	183.21	73839.862	
		4	0	162.2	66859.104	
	2	5	0	158.05	58746.996	
		6	0	159.47	75691.909	
	1	1	4	172.19	62624.888	
		2	4	174.21	60844.366	
		3	4	166.87	52923.795	
		4	4	150.96	81117.406	
		2	5	4	153.48	76224.879
			6	4	152.52	71821.233
	1	1	8	161.45	61900.429	
		2	8	158.69	63794.509	
		3	8	156.82	60445.756	
		4	8	137.92	65473.758	
		2	5	8	141.06	61770.485
			6	8	136.4	51357.853
HENO DE ALFALFA	1	1	0	166.99	81337.909	
		2	0	162.64	81261.786	
		3	0	168.39	83719.492	
		4	0	127.63	71693.753	
	2	5	0	129.93	72023.965	
		6	0	129.6	74497.204	
	1	1	4	164.72	73302.164	
		2	4	161.95	75150.785	
		3	4	165.53	73245.274	
		4	4	134.23	67143.782	
	2	5	4	129.87	69169.417	
		6	4	127.74	63985.534	
1	1	8	153.93	66706.863		
	2	8	158.95	64481.115		
	3	8	158.38	66450.125		
	4	8	122.62	57292.323		
2	5	8	129.86	59121.658		
	6	8	127.76	56561.333		

1= Repetición; 2= Producción de gas; 3= Metano

Anexo 6. Valores de la concentración molar de ácido acético y propiónico

SUSTRATO	N° CORRIDA	1 ^R	NIVEL DE INCLUSIÓN (porcentaje)	ACÉTICO	PROPIÓNICO
				mM	mM
PAJA DE CEBADA	1	1	0	37.0867	13.0797
		2	0	41.8775	14.6397
	2	3	0	39.0168	13.3365
		4	0	45.7695	15.7377
	1	1	4	37.8587	12.9808
		2	4	38.4576	13.4718
	2	3	4	42.3968	14.4373
		4	4	41.3159	14.1853
	1	1	8	39.0214	13.3706
		2	8	30.4044	10.1816
	2	3	8	32.2135	10.4293
		4	8	42.7811	14.0826
HENO DE ALFALFA	1	1	0	36.2445	10.3527
		2	0	45.0658	12.9647
	2	3	0	32.0892	9.6618
		4	0	36.3383	10.8542
	1	1	4	30.826	8.3533
		2	4	41.1682	11.5222
	2	3	4	33.8666	9.695
		4	4	40.7115	11.397
	1	1	8	48.0616	12.8937
		2	8	45.3045	12.0421
	2	3	8	38.3995	10.7561
		4	8	33.1746	9.0594

1= Repetición

Anexo 7. Valores de la concentración molar de ácido isobutírico y butírico

SUSTRATO	N° CORRIDA	1 ^R	NIVEL DE INCLUSIÓN (porcentaje)	ISOBUTÍRICO	BUTÍRICO
				mM	mM
PAJA DE CEBADA	1	1	0	0.9319	4.9312
		2	0	0.9843	5.557
	2	3	0	0.7646	4.4358
		4	0	0.8219	5.1222
	1	1	4	0.8805	4.8242
		2	4	0.9053	5.0786
	2	3	4	0.7798	4.7263
		4	4	0.7457	4.6226
	1	1	8	0.8998	5.0675
		2	8	0.8499	3.8332
	2	3	8	0.6942	3.3786
		4	8	0.7475	4.5361
HENO DE ALFALFA	1	1	0	1.2101	4.5036
		2	0	1.3911	5.6026
	2	3	0	0.9667	3.6535
		4	0	1.0553	3.8684
	1	1	4	1.0026	3.543
		2	4	1.2201	4.8366
	2	3	4	0.9504	3.4378
		4	4	1.0737	3.9128
	1	1	8	1.3264	5.3204
		2	8	1.2711	4.9887
	2	3	8	0.9766	3.5518
		4	8	0.8753	2.9723

1= Repetición

Anexo 8. Valores de la concentración molar de ácido isovalérico y valérico

SUSTRATO	N° CORRIDA	¹ R	NIVEL DE INCLUSIÓN (porcentaje)	ISOVALÉRICO	VALÉRICO
				mM	mM
PAJA DE CEBADA	1	1	0	1.0725	0.7659
		2	0	1.2253	0.8612
	2	3	0	0.815	0.659
		4	0	0.9502	0.7355
	1	1	4	1.0522	0.7539
		2	4	1.1161	0.7793
	2	3	4	0.8321	0.6885
		4	4	0.8158	0.6695
	1	1	8	1.0821	0.7648
		2	8	0.927	0.6926
	2	3	8	0.6537	0.5713
		4	8	0.7682	0.6585
HENO DE ALFALFA	1	1	0	1.7444	0.942
		2	0	2.1662	1.1334
	2	3	0	1.3644	0.7834
		4	0	1.5269	0.8545
	1	1	4	1.4131	0.7418
		2	4	1.8589	0.9683
	2	3	4	1.3231	0.7328
		4	4	1.5102	0.8161
	1	1	8	2.0039	1.0126
		2	8	1.8626	0.9315
	2	3	8	1.3055	0.7492
		4	8	1.1553	0.6414

1= Repetición