



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA

“Efecto del peróxido de hidrógeno en la calidad del forraje verde hidropónico”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Ingeniero Agroindustrial

Presenta:

Alma Rosa Martínez Ramos

Dirigida por:

M. en T.A. Lina García Mier

C.U. Santiago de Querétaro, Qro., Noviembre de 2014.

DEDICATORIAS

A Dios

A mi Madre, Ángela

A mi Padre, Alejandro

Y a mis hermanos Andrea y Alberto.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Ángela y Alejandro que me han apoyado en todo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ingeniería y al cuerpo docente que me acogió y dirigió con honestidad.

A mis sinodales Bere, la Dra. Angélica, el Dr. Ramón y a mi directora Lina por guiarme y apoyarme.

A mi tutor, el Maestro Adán por su atención y apoyo moral y académico.

A CONACYT por el apoyo dado a través del proyecto Programa de Desarrollo comunitario Amazcala, El Marques, Qro. y a la Maestra Beatriz Utrilla Sarmiento, que está a cargo.

A Chuy (Jesús Mendoza) por su apoyo técnico cuando más lo necesitaba.

RESUMEN

Con el objetivo de aumentar la calidad del forraje verde hidropónico, se realizó el presente estudio donde se hicieron aplicaciones del elicitor peróxido de hidrógeno en tres diferentes dosis: 5, 10 y 20 mM y en dos formas de aplicación, en la imbibición y de manera foliar durante el desarrollo del forraje. Se utilizó semilla de cebada (*Hordeum vulgare*), los riegos se realizaron solo con agua y se cosechó a los 8 días después de la germinación. Las variables evaluadas fueron: altura, peso de masa húmeda por charola, contenido de humedad, contenido de taninos, fenoles, capacidad antioxidante por ABTS y DPPH, Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA), producción de gas y digestibilidad *in vitro*. Se realizó un diseño experimental de bloques al azar. Se encontraron diferencias significativas en la producción de gas *in vitro* entre los tratamientos 20 mM aplicación en la imbibición y 10 mM aplicación foliar; El tratamiento 20 mM aplicación en la imbibición disminuyó la producción de gas. Las aplicaciones en la imbibición dieron valores más notables y positivos que las aplicaciones de manera foliar. En el tratamiento de 5 mM en la imbibición incrementó el peso de masa húmeda por charola en un 43.70%, el contenido de fenoles en un 14.33%, el porcentaje de FDA en un 17.57%, el de FDN en un 9.19% y el contenido de taninos en un 42%. A pesar del incremento de taninos y de FDN y FDA, la digestibilidad también aumentó en un 2.04% y la producción de gas disminuyó en un 7.91%. Ningún tratamiento rebasó los límites recomendados en el contenido de taninos, FDA y FDN, que se consideran para que el forraje sea de buena calidad. Mediante la aplicación controlada de peróxido de hidrógeno en el forraje verde hidropónico, en algunos tratamientos se logró disminuir la producción de gas y aumentar otras variables como la digestibilidad, la capacidad antioxidante y el peso de masa húmeda por charola.

SUMMARY

In order to increase the quality of hydroponic green forage, in the present study hydrogen peroxide is applied as an elicitor in three different doses 5, 10 and 20 mM and two forms of application (foliar to forage during development and embedding). It was used seeds of barley (*Hordeum vulgare*). Watering was performed only with water and the forage was harvested at 8 days after germination. The variables evaluated were: height, weight of wet mass per tray, moisture content, tannin content, phenols, antioxidant capacity by ABTS and DPPH, Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), gas production and *in vitro* digestibility. It was performed an experimental randomized block design. It was found significant differences between treatments 20 mM imbibition applications and 10 mM foliar applications; the treatment 20 mM imbibition applications decreased gas production. Imbibition applications were more significant and positive than foliar applications. The Treatment of 5 mM in imbibition increased weight of wet mass per tray in 43.70%, the content of phenols in 14.33%, the percentage of ADF in 17.57%, the NDF 9.19% and the content tannins by 42%. Despite the increase in tannins and NDF and ADF digestibility also increased by 2.04% and gas production decreased by 7.91%. Any treatment exceeded the recommended tannin content, ADF and NDF, which are considered to be of good forage quality limits. In some treatments it was found a decrease in gas production and an increase of other variables like digestibility, antioxidant capacity and the weight of wet mass per tray.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
I. INTRODUCCION	7
II. MARCO TEÓRICO	9
2.1 ELICITORES.....	9
2.1.1 Peróxido de hidrogeno.....	10
2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	16
2.3 IMPORTANCIA DE LOS TANINOS.....	16
2.4 FERMENTACIÓN RUMINAL.....	19
2.4.1 Bacterias.....	20
2.4.2 Hongos	21
2.4.3 Protozoos	21
2.4.4 Degradación de los carbohidratos	22
2.4.5 Degradación de las proteínas.....	25
2.5 FORRAJE VERDE HIDROPÓNICO.....	26
2.5.1 Ventajas del FVH.....	28
III. ANTECEDENTES	30
3.1 ELICITORES.....	30
3.2 EMISIÓN DE METANO	32
3.2.1 Microorganismos metanogénicos	34
3.2.2 Alternativas para la reducción de metano emitido por rumiantes	34
3.2.3 Aditivos al alimento.....	35
3.3 TANINOS.....	37

3.4	PRODUCCIÓN DE FVH.....	40
IV.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	43
4.1	OBJETIVO GENERAL	43
4.1.1	Objetivos particulares	43
4.2	HIPÓTESIS	43
V.	METODOLOGÍA.....	44
5.1	DISEÑO DE TRATAMIENTOS	44
5.2	MATERIAL VEGETAL	44
5.3	ACONDICIONAMIENTO DEL INVERNADERO.....	45
5.4	LIMPIEZA DE SEMILLA.	46
5.5	MANUFACTURA DE COSTALES	46
5.6	DESINFECCIÓN DE LA SEMILLA	47
5.7	IMBIBICIÓN	47
5.8	CHAROLAS	48
5.9	GERMINACIÓN	48
5.10	DESARROLLO DEL CULTIVO.....	49
5.11	COSECHA.....	50
5.12	PRUEBAS DE LABORATORIO	51
5.12.1	Metabolitos secundarios	51
5.12.1.1	Taninos.....	51
5.12.1.2	Fenoles.....	52
5.12.1.3	Capacidad antioxidante-ABTS	52
5.12.1.4	Capacidad antioxidante-DPPH.....	52
5.12.2	Pruebas bromatológicas.....	53
5.12.2.1	FDN.....	53
5.12.2.2	FDA.....	54
5.12.3	Digestibilidad y producción de gas in vitro.....	54
5.13	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
6.1	VARIABLES FENOLÓGICAS.....	55

6.1.1	Altura	55
6.1.2	Peso de masa húmeda (MH) por charola	56
6.2	CONTENIDO DE HUMEDAD.....	57
LETRAS IGUALES INDICAN QUE NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS.....		58
6.3	METABOLITOS SECUNDARIOS.....	58
6.3.1	Taninos.....	58
6.3.2	Fenoles.....	60
6.3.3	Capacidad antioxidante-ABTS.....	61
6.3.4	Capacidad antioxidante-DPPH.....	63
6.4	DETERMINACIÓN DE FIBRA	65
6.4.1	FDA	65
6.4.2	FDN	67
6.5	PRODUCCIÓN DE GAS Y DIGESTIBILIDAD IN VITRO	69
6.5.1	Producción de gas in vitro	69
6.5.2	Digestibilidad in vitro de MO y MS	73
6.6	RESUMEN DE RESULTADOS.....	76
VII.	CONCLUSIONES.....	80
VII.	LITERATURA CITADA.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de moléculas activadoras resultantes de la interacción planta-patógeno o planta-insectos plaga y algunas respuestas de defensa	10
Figura 2. Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO).	13
Figura 3. Bioformación del ácido shikímico y compuestos análogos.....	17
Figura 4. Ácido corísmico precursor de los fenilpropanoides.	18
Figura 5. Invernadero utilizado en el campus Amazcala, FI UAQ.	45
Figura 6. Raquets para sostener FVH dentro del invernadero.	45
Figura 7. Limpieza de semilla.....	46
Figura 8. Pesaje de la semilla de cebada.....	46
Figura 9. Desinfección de la semilla.	47
Figura 10. Uso del peróxido de hidrogeno en la imbibición.	48
Figura 11. Charolas para producir FVH en el campus Amazcala, FI UAQ.	48
Figura 13. Desarrollo del cultivo de FVH de cebada.	49
Figura 14. Aplicación de peróxido de hidrógeno de manera foliar a los tratamientos.....	50
Figura 15. Pesaje de charolas el día de cosecha.....	50
Figura 16. Molienda de muestras en molino PULVEX con criba de 1 mm.	51
Figura 17. Efecto del tipo de aplicación del H ₂ O ₂ en el peso de MH por charola en cada tratamiento.....	57
Figura 18. Efecto del tipo de aplicación de H ₂ O ₂ en el contenido de taninos condensados en cada tratamiento.	60
Figura 19. Efecto del tipo de aplicación de H ₂ O ₂ en el porcentaje de la capacidad antioxidante ABTS en cada tratamiento.	63
Figura 20. Comparación de la capacidad antioxidante de distintos productos alimenticios. A: FVH de cebada, B: Maíz variedad "Pinto", C: Mortilla, D: Maíz, E: Pimiento variedad "Caribe".....	65
Figura 21. Comparación del tipo de aplicación de H ₂ O ₂ en el porcentaje de FDA.	67
Figura 22. Comparación del tipo de aplicación del peróxido de hidrógeno en el porcentaje de FDN.	68

Figura 23. Producción de gas <i>in vitro</i> durante el tiempo de incubación.	70
Figura 24. Relación entre el contenido de taninos y la producción de gas <i>in vitro</i> por método de aplicación del peróxido de hidrógeno.	71
Figura 25. Comparación del tipo de aplicación en la producción de gas <i>in vitro</i> . ..	72
Figura 26. Comparación de digestibilidad <i>in vitro</i> de distintas especies. A: FVH de cebada, B: FVH de maíz 1, C: FVH de maíz 2, D: FVH de alfalfa.	74
Figura 27. Comparación del tipo de aplicación en el porcentaje de digestibilidad.	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Moléculas activadoras reportadas como inductores de resistencia.	11
Cuadro 2. Gases de efecto invernadero en México, por tipo de gas y por sector (gigagramos de equivalentes de CO ₂).....	36
Cuadro 3. Concentración de H ₂ O ₂ para los distintos tratamientos.	44
Cuadro 4. Alturas promedio correspondientes a los diferentes tratamientos.	55
Cuadro 5. Peso promedio de MH por charola correspondiente a los distintos tratamientos.....	57
Cuadro 6. Contenido de humedad promedio de los diferentes tratamientos.....	58
Cuadro 7. Contenido de taninos condensados para los diferentes tratamientos...	59
Cuadro 8. Concentración de fenoles en los diferentes tratamientos.	61
Cuadro 9. Capacidad antioxidante ABTS de cada tratamiento.	62
Cuadro 10. Capacidad antioxidante DPPH de cada tratamiento.....	64
Cuadro 11. Porcentaje de Fibra Detergente Acido (FDA) para cada tratamiento..	66
Cuadro 12. Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (FDN) en cada tratamiento....	68
Cuadro 13. Producción de gas in vitro en ml gas/g MS para cada tratamiento.	70
Cuadro 14. Porcentaje de digestibilidad <i>in vitro</i> por MS para cada tratamiento.	73
Cuadro 15. Porcentaje de digestibilidad <i>in vitro</i> en MO por tratamiento.....	76
Cuadro 16. Resultados a los tratamientos en cada variable analizada	77
Cuadro 17. Porcentaje de incremento o decremento de las variables en cada tratamiento respecto al testigo	78

I. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes, especialmente los bovinos, aportan al medio ambiente importantes cantidades de gas metano (CH_4), el cual es un gas de efecto invernadero (GEI) que contribuye al calentamiento global. Las aportaciones de gas metano por parte del ganado bovino son a partir de la fermentación entérica y del manejo del estiércol. Éstas representan el 60% de las emisiones totales de gas metano en el planeta (De Blas y col., 2008).

Por otro lado, la emisión de metano representa energía alimenticia que se transforma en forma de gas y no es aprovechada por el animal (Carmona y col., 2005). La dieta del ganado bovino debe ser correctamente balanceada para que cuente con la calidad suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales del ganado, les permita un buen desempeño y ayude a reducir la producción de gas metano.

Se ha reportado que los elicitores (como el peróxido de hidrogeno) han sido utilizados para aumentar las propiedades nutraceuticas de los alimentos para el ser humano, y por lo tanto su calidad (Landeta-Riverol, 2011).

En los sectores productivos como el ganadero ha desmejorado el rendimiento de las pasturas debido a las condiciones climáticas, al espacio o al alto costo de producción, por lo que la hidroponía se ha perfilado como una técnica que mejora los rendimientos del forraje debido a que puede obtenerse en cualquier época del año y en cualquier localidad geográfica, así mismo se puede realizar en cualquier material que permita contener la semilla como son: tubos rígidos de PVC, metálicos en desuso o de desecho (Romo, 2010).

De esta forma, se presenta la inquietud de estudiar el efecto que podría tener la utilización de la hidroponía en conjunción con el uso del peróxido de hidrógeno en la calidad del forraje verde hidropónico.

El contenido de taninos en la alimentación de los rumiantes puede tener efectos benéficos. Existen estudios donde disminuyen las emisiones de metano por rumiantes que consumieron forrajes con altos niveles de taninos, determinados *in vitro* e *in vivo* en ganado vacuno (Gurbuz, 2009).

Los elicitores (como el peróxido de hidrógeno) son moléculas que pueden activar respuestas de defensa en las plantas mediante la síntesis de fitoalexinas y en particular, de taninos (Riveros, 2010).

Adicionalmente, en un sistema de producción de forraje verde hidropónico se tiene menor pérdida de agua que en un sistema convencional, puede realizarse en un espacio pequeño dependiendo de la cantidad que se desea producir, el periodo de producción es corto y la inversión también es menor que en una producción convencional.

Por lo anterior, se considera que la aplicación de peróxido de hidrogeno de forma controlada es una opción para incrementar el contenido de taninos en el forraje verde hidropónico de cebada, y por lo tanto, una opción para reducir la emisión de metano por parte del ganado vacuno.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Elicitores

El concepto de activador, fue utilizado para moléculas capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en la planta, en ausencia del patógeno (Riveros y col., 2001). Las fitoalexinas al igual que los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados en respuesta a alguna invasión microbiana, con la diferencia de que los metabolitos secundarios son compuestos permanentes en las plantas (Vargas, 2011).

En la actualidad, esta definición, se ha generalizado y aceptado para cualquier molécula química que pueda estimular mecanismos de defensa o asociados con la respuesta de defensa en las plantas. Estas moléculas activadoras hacen referencia a un amplio ámbito de compuestos, los cuales pueden ser derivados a partir de plagas, de plantas u de otros microorganismos, así como a partir de preparados biológicos de origen vegetal o de análogos producidos sintéticamente (Riveros, 2001).

En una relación planta-patógeno, es conveniente hacer la distinción entre moléculas activadoras de origen vegetal, llamadas activadoras endógenas y las de origen parasitario o producidas por algún agente físico externo, conocidas como activadoras exógenas (Figura 1).

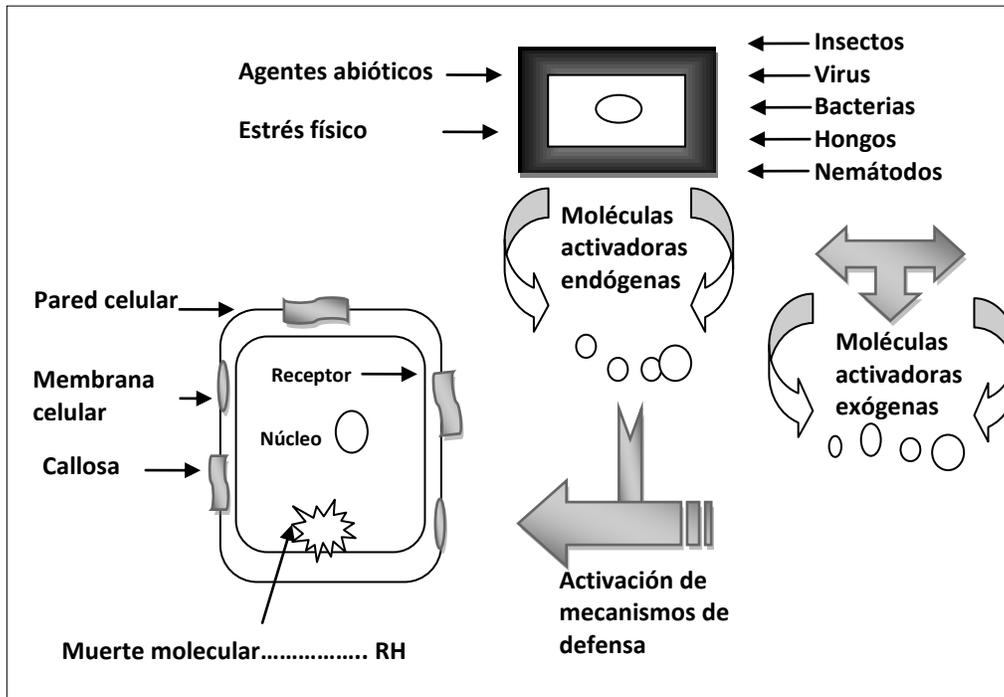


Figura 1. Tipos de moléculas activadoras resultantes de la interacción planta-patógeno o planta-insectos plaga y algunas respuestas de defensa. Se observa el receptor de membrana y la traducción de señal desde el núcleo.

Fuente: Riveros, 2001.

En el caso de las primeras, se sabe que las células vegetales poseen una pared celular, la cual presenta un 90% de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectinasa) asociados a un 10% de proteínas y esta pared celular puede liberar moléculas activadoras endógenas, responsables de la inducción de mecanismos de defensa. Las moléculas activadoras exógenas pueden ser clasificadas en bióticas y abióticas (Cuadro 1).

2.1.1 Peróxido de hidrogeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula importante de especies reactivas de oxígeno (ERO) que sirve como una señal de estrés oxidativo y la activación de cascadas de señalización como resultado de la respuesta temprana de la planta al estrés biótico. Esta respuesta también puede ser generada con la aplicación de elicitors, moléculas estables que inducen la activación de cascadas de

transducción de las vías hormonales, el gatillo resistencia al estrés ambiental inducida (Mejía-Teniente y col., 2013).

Cuadro 1. Moléculas activadoras reportadas como inductores de resistencia.

Origen biótico	Origen abiótico
<ul style="list-style-type: none"> • Hongos, bacterias, virus, nematodos, insectos (asperjados, inyectados o puestos en contacto) • Fragmentos de pared celular desde bacterias • Fracciones de pared celular desde hongos • Fragmentos de pared celular de células vegetales • Fluido intracelular extraído de plantas infectadas • Extractos de origen vegetal • Preparaciones de cultivos en crecimiento de: <ul style="list-style-type: none"> ○ bacterias, levaduras e insectos • Fluido de esporas en germinación de hongos • Preparaciones a partir de aparatos bucales y secreciones de insectos (volicitín) • Fracciones de glucano, quitín, pectina o quitosándeградados desde la pared de microorganismos por tratamiento con enzimas • Exudados de rizobacterias promotoras de crecimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatos de potasio o de sodio • Especies de oxígeno activo (ERO): ácido peracético, peróxido de hidrógeno, entre otras. • Cloruro férrico: Aliette (fosetil-Al) • Sílica, glicina, ácido glutámico, ácido α y β-aminobutírico y ácido α y β-aminoisobutírico. <ul style="list-style-type: none"> ○ D-fenilalanina, D-alanina, DL-alanina, DL-valina, DL-triptofano y riboflavina • Ácido <i>m</i>-hidroxibenzoico, ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico. Ácido salicílico, metiléster del ácidojasmónico, etileno. • Ácido isovanílico, ácido vanílico, ácido siringico, ácido protocatecuico, floroglucinol, ácido gálico, ácido 1, 3, 5 benzenotricarboxílico, ácido poliacrílico. • Ácido D-galacturónico, glicolato, ácido oxálico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico. • Paraquat, acifluorfen, clorato de sodio, óxido nítrico, ácido 2,6-dicloroisonicotínico • Benzo(1, 2, 3)thiadiazol-7-ácido carbotioico s-metil éster (Probenazole), ácido 2,2 dicloro-3,3 dimetilciclopropanocarboxílico • Penantrolina y sales de metales complejos como: cobalto, hierro y cobre • Laminarina, quitosán, quitín, quitin coloidal y glucanos sintéticos • Messenger[®], detergentes

Fuente: Riveros, 2001.

Las plantas responden a la infección por patógenos, al daño mecánico o heridas inducidas por herbívoros con una producción localizada de especies reactivas de oxígeno, un fenómeno referido con frecuencia como "explosión oxidativa" (Benzer-Benzer y col., 2008).

Cuando una célula vegetal detecta la presencia de un patógeno se activa una reacción de defensa inducida. Esta reacción es más severa a nivel local, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno, y más débil a nivel sistémico, en los tejidos no infectados de la planta. Este tipo de reacción permite potenciar las barreras de defensa, tanto químicas como estructurales en el tejido que está siendo atacado. A la reacción local se le llama respuesta de hipersensibilidad (RH) y puede conducir a la necrosis del tejido infectado. La necrosis se produce fundamentalmente por la acumulación abundante de compuestos químicos, entre los cuales se encuentran la producción de especies reactivas de oxígeno y las fitoalexinas. Específicamente, el término "especies reactivas de oxígeno" incluye a todas las moléculas derivadas del oxígeno, a los radicales y a los no radicales (Benzer-Benzer., 2008). El término también incluye al óxido nítrico (ON), una molécula de señalización importante en animales y plantas (Halliwell y col., 1999).

Un radical libre es cualquier especie capaz de tener una existencia independiente que contiene uno o más electrones no apareados (Halliwell y Gutteridge, 2006). Existen diversos tipos de radicales libres en sistemas biológicos, pero esta revisión se enfocará específicamente a los radicales libres derivados del oxígeno, debido a su importancia durante la patogénesis (Benzer-Benzer y col., 2008).

a) La química del oxígeno activo. El oxígeno molecular en su forma más estable (O_2 , en esta forma se encuentra en el aire que nos rodea) se puede considerar como un radical libre pues tiene dos electrones no apareados, con giros paralelos, y es un potente agente oxidante, sin embargo, para oxidar una molécula no radical y aceptar un par de electrones estos electrones deben de tener el mismo giro (paralelo) para ocupar los orbitales vacantes en el O_2 . Los electrones de un átomo o de una molécula no cumplen con este criterio puesto que tienen giro antiparalelo. Esta restricción de giro hace que el O_2 acepte sólo un electrón a la vez y explica el porqué reacciona lentamente con la mayoría de las moléculas no radicales. Por el contrario, reacciona notablemente rápido con radicales por transferencia de un solo electrón (Halliwell y Gutteridge,

2006). Este párrafo no concide con con la alineación izquierda con respecto al de abajo.

Así, aunque el oxígeno molecular en su estado basal es poco reactivo, su reducción parcial genera ERO, incluyendo el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno, y el radical hidroxilo (OH^-). La primera reacción en la reducción parcial del oxígeno molecular es la adición de un electrón para formar O_2^- . Este puede ser protonado a pH bajo ($pK_a=4.8$) para formar el radical perhidroxilo (HO_2^\bullet). El O_2^- y HO_2^\bullet sufren una dismutación espontánea para producir H_2O_2 (Figura 2).

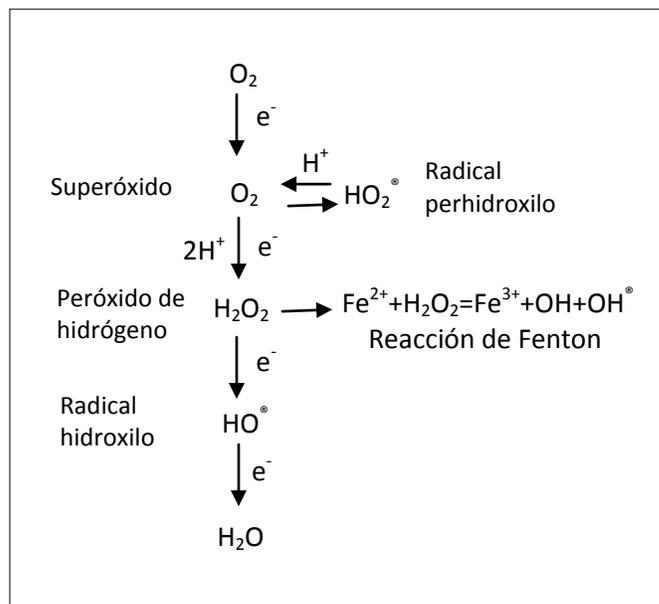


Figura 2. Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las ERO normalmente son generadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular. Fuente: Benzer-Benzer y col., 2008.

El H_2O_2 es estable y menos reactivo que el O_2^- . Sin embargo, en la presencia de metales de transición reducidos como el Fe^{2+} , que pueden estar libres o formando complejos con agentes quelantes o proteínas, puede ocurrir la formación del OH^- dependiente de H_2O_2 , y el O_2^- puede actuar como el agente reductor inicial para el metal. El OH^- es un oxidante muy fuerte y puede iniciar reacciones en cadena de

radicales con una gran variedad de moléculas orgánicas, esto puede llevar a la peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas, y degradación de ácidos nucleicos. La mayoría de las moléculas biológicas no son radicales y cuando un radical libre reacciona con un no radical, se forma un nuevo radical y sucede una reacción en cadena (Halliwell y Gutteridge, 2006).

b) Formación de las especies reactivas de oxígeno. Las ERO generadas durante la patogénesis son producidas de manera característica fuera de la membrana plasmática de las células vegetales (apoplasto). Mediante el uso de inhibidores específicos, se han postulado dos mecanismos enzimáticos como los responsables más probables de esta producción en el (apoplasto). El primero involucra a la enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática, la cual se considera como la principal fuente de ERO en respuesta a varios patógenos. En plantas, lo mismo que en animales, existe una familia génica de estas oxidasas. Diferentes miembros de esta familia de oxidasas pueden mediar la producción de ERO en diferentes situaciones, no sólo ante la acción de patógenos sino también en otras respuestas al entorno, así como en procesos del desarrollo. El segundo mecanismo está formado por las peroxidasas de la pared celular, las cuales pueden contribuir a la producción apoplástica de ERO en algunas interacciones planta patógeno. Ambos mecanismos enzimáticos pueden producir ERO en diferentes contextos espacio/temporales, lo cual sugiere una diferencia funcional entre las ERO producidas fuera de la célula vegetal (Benzer-Benzer y col., 2008).

c) ERO en la interacción planta/patógeno. En 1983 se reportó la generación del anión superóxido y peróxido de hidrógeno como una nueva respuesta distinta a las defensas clásicas en plantas. Las ERO desempeñan un papel importante durante la defensa de las plantas en contra de patógenos. Como resultado de la respuesta de la planta, se producen ERO por un incremento en la actividad de las enzimas NADPH oxidasa, ubicadas en la membrana plasmática, peroxidasas unidas a la pared celular y amino-oxidasa ubicadas en el apoplasto. A diferencia del anión superóxido, el peróxido de hidrógeno puede

difundirse al interior de la célula y activar los genes de defensa, conduciendo a la muerte celular programada (MCP). Además, la actividad de las enzimas que detoxifican a las ERO, tales como catalasa y ascorbato peroxidasa son suprimidas por ácido salicílico y óxido nítrico, como resultado se crea un balance en favor de la acumulación de ERO. La inducción de la MCP eventualmente limita el avance del patógeno más allá del sitio de infección (Benzer-Benzer y col., 2008).

d) Defensas en contra de la producción de las ERO. Para disminuir el daño provocado por la producción de ERO los organismos aeróbicos han evolucionado mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen al ascorbato, glutatión, tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides. Estos eliminan directamente al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno por su capacidad antioxidante intrínseca. Los mecanismos enzimáticos incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (AP), glutatión peroxidasa (GP) y catalasa (CAT). SOD actúa como la primera línea de defensa en contra de las ERO transformando el O_2^- en H_2O_2 . Las enzimas AP, GP y CAT subsecuentemente lo detoxifican reduciéndolo a H_2O . A diferencia de la mayoría de los organismos, las plantas tienen múltiples genes que codifican para SOD y AP, las cuales están específicamente localizadas en los cloroplastos, la mitocondria, peroxisomas, citosol y apoplasto (Benzer-Benzer y col., 2008). La extensión del estrés oxidativo en una célula está determinada por la cantidad de superóxido, H_2O_2 y radicales hidroxilo. Por lo tanto, el balance de las actividades de SOD, AP y CAT es crucial para suprimir los niveles tóxicos de ERO en la célula. Si cambia el balance de estas enzimas se inducen mecanismos compensatorios que involucran a otras enzimas, por ejemplo, cuando se reduce la actividad de CAT otras enzimas como ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión peroxidasa (GPX) son inducidas (Benzer-Benzer y col., 2008).

2.2 Metabolitos secundarios

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Como parte de la protección química, una estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios, en contra de herbívoros o con actividad antioxidante.

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no sólo tiene una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones como, el consumo por herbívoros, el ataque de microorganismos como hongos, virus y bacterias, la competencia por el espacio, la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico. Los metabolitos secundarios se dividen en nitrogenados y no nitrogenados. Los que contiene nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los no nitrogenados se dividen en terpenoides, flavonoides, poliacetilenos, policetidos y fenilpropanoides. Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato (Sepúlveda y col., 2003).

2.3 Importancia de los taninos

Dentro de los compuestos aromáticos existe un grupo que se conoce como fenilpropanoides los cuales a su vez se constituyen por fenoles, lignina, lignanos y taninos, entre otros. La glucosa es el precursor de los fenilpropanoides a través del intermediario clave: el ácido shikímico (Marcano y Hasegawa., 2002).

Los taninos son producidos por las plantas como metabolitos secundarios durante la síntesis de aminoácidos aromáticos a partir del ácido shikímico, con la capacidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas (Bernal, 2007). La ruta metabólica que conduce

el ácido shikímico involucra un intermediario de siete átomos de carbono proveniente de la condensación de fosfoenolpiruvato y eritrosa, según se indica en la Figura 3 (Marcano y Hasegawa, 2002).

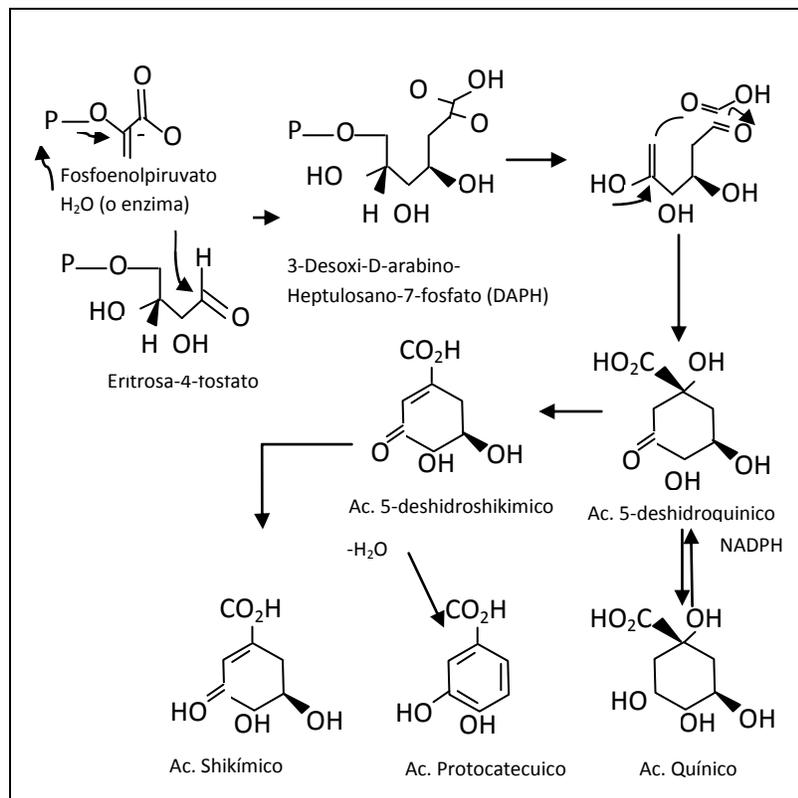


Figura 3. Bioformación del ácido shikímico y compuestos análogos.

Fuente: **Marcano y Hasegawa, 2002.**

El ácido shikímico, se condensa con una unidad de fosfoenolpiruvato y produce ácido corísmico, precursor de los fenilpropanoides Figura 4. Los taninos, sustancias que producen el endurecimiento del cuero, están ampliamente distribuidos en dicotiledóneas leñosas; su función en las plantas no está clara, pero debido a su abundancia en tejidos jóvenes y en las heridas causadas en el tallos, particularmente aquellas cerca del suelo, se cree que son utilizados por el vegetal como protección contra infecciones de hongos y parásitos (los arboles pobres en taninos se pudren rápidamente).

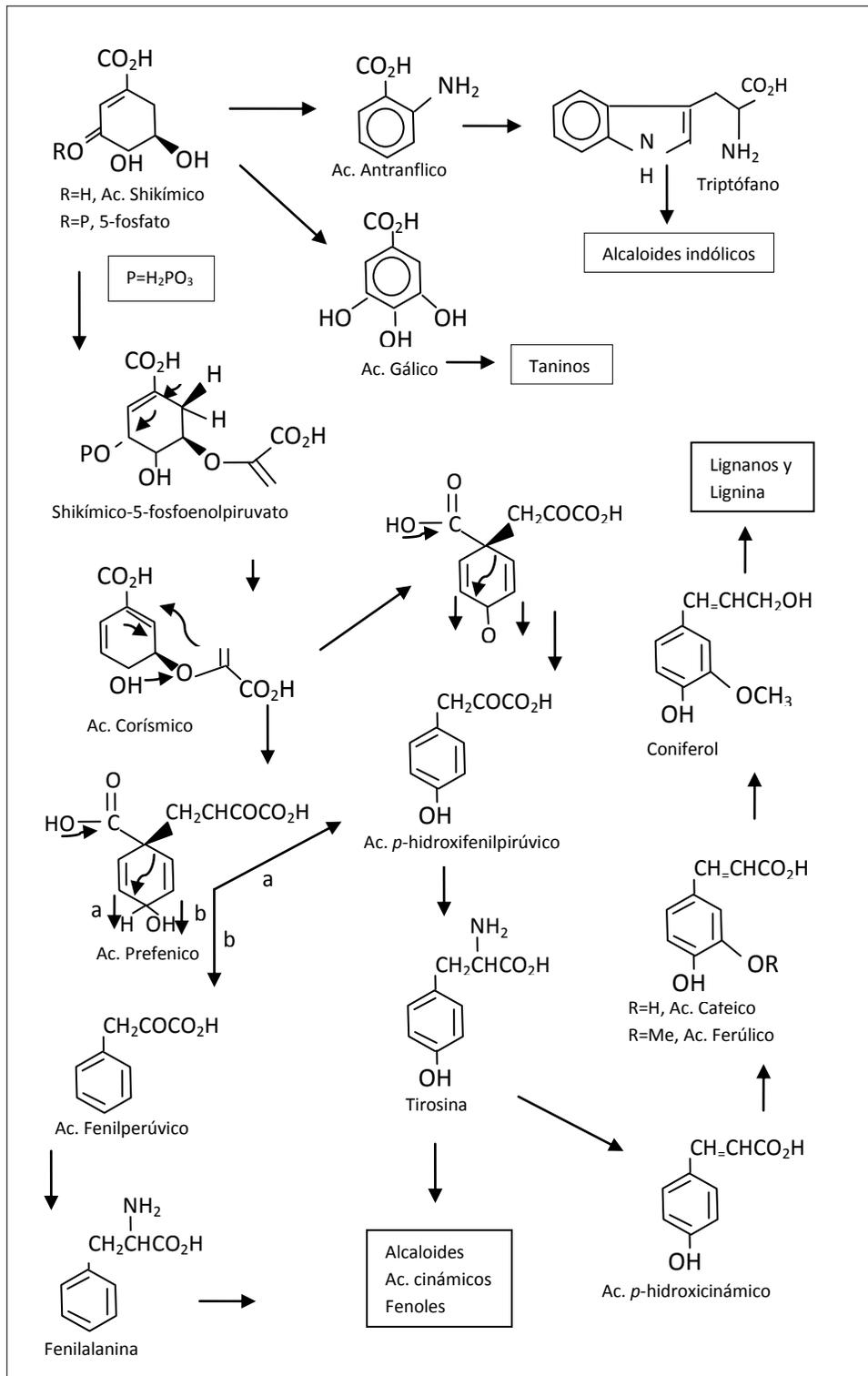


Figura 4. Ácido corísmico precursor de los fenilpropanoides.

Fuente: Marcano y Hasegawa, 2002.

Se extraen con agua ya que a pesar de su complejidad estructural son altamente oxigenados y/o presentan azúcares en su composición que le dan carácter hidrofílico (Marcano y Hasegawa, 2002).

Los taninos se clasifican en:

- Hidrolizables, (galotaninos y elagitaninos) aquellos que por tratamiento con ácido o por enzimas, se separan en la aglicona (ácidos gálico y elágico) y los azúcares (Marcano y Hasegawa, 2002).
- Condensados, aquellos que por tratamiento con ácido no se degradan, se polimerizan aún más, convirtiéndose en masas amorfas insolubles como flobafenos; estos son polímeros derivados de 3-hidroxi- y 3,4-dihidroxi-flavanos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Se atribuyen a los taninos diversas actividades biológicas, tales como antibacteriana, molusquicida, antihelmíntico, antihepatóxica, antiviral, antitumoral, citotóxica, inhibidora enzimática, entre otras. Al menos tres propiedades generales de los taninos son responsables de esos comportamientos: 1) habilidad quelante con metales, 2) propiedad antioxidante y atrapador de radicales libres y 3) habilidad para formar complejos con macromoléculas como proteínas incluyendo enzimas y polisacáridos. La interacción con proteínas es una de las más importantes y se conoce que los taninos tienen mayor afinidad con las proteínas ricas en prolina y de conformación flexible enzimas de la saliva, caseína, colágeno-gelatina; siendo la última abundante en la piel (Marcano y Hasegawa, 2002).

2.4 Fermentación ruminal

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica. La población microbiana se mantiene al ingerir y masticar alimentos con regularidad, añadiendo tampones y eliminando los ácidos producidos, arrastrando los residuos alimenticios no digeribles y los productos microbianos, y manteniendo unas condiciones apropiadas de pH, temperatura y humedad para el crecimiento microbiano. Estos microorganismos dependen del rumiante para disponer de las condiciones óptimas

para su crecimiento, y el rumiante depende de los productos de fermentación anaeróbica del alimento fibroso que ingiere y de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas. El metabolismo del rumiante está enfocado a aprovechar los productos de la fermentación microbiana como los ácidos grasos volátiles (AGV); sin embargo, no todos los productos de la fermentación microbiana son útiles para el rumiante, también los hay de inútiles como el metano, o incluso nocivos como el amoníaco y los nitratos (Rotger, 2004).

La mayoría de microorganismos presentes en el rumen funcional son anaeróbicos estrictos, y estos pueden ser bacterias, protozoos u hongos. El número relativo de las diferentes especies dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las múltiples interacciones entre ellos (Rotger, 2004).

2.4.1 Bacterias

En el rumen se encuentran entre 10^{10} y 10^{11} bacterias/ml de contenido ruminal. Son el grupo de microorganismos más abundante, representan aproximadamente la mitad de la biomasa ruminal y una mayor proporción de la actividad metabólica ruminal, que está inversamente relacionada con el tamaño del microorganismo.

Las bacterias se pueden clasificar en función del substrato que utilizan, de los productos formados o de sus requerimientos nutricionales. En función de su principal substrato de fermentación, se pueden clasificar en microorganismos que degradan celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina o lípidos. En una clasificación más extensa, se puede incluir el grupo de bacterias productoras de metano, de amoníaco y bacterias con actividad ureasa (Rotger, 2004).

Otra clasificación bacteriana, es la que se hace en función de la fase física a la que se encuentran asociadas dentro del rumen. Aproximadamente el 75% de las bacterias se encuentran asociadas a las partículas de alimento y son las responsables, en mayor parte, de la degradación ruminal del alimento; un segundo grupo bacteriano más inespecífico, se encuentra asociado a la fase líquida y está formado por las bacterias que se han soltado de las partículas y poblaciones con

altos ritmos de división que subsisten a partir de nutrientes solubles en el líquido ruminal. Finalmente, un tercer grupo de bacterias anaeróbicas facultativas adheridas al epitelio ruminal. Estas bacterias asociadas al epitelio ruminal consumen rápidamente el oxígeno que entra con el alimento y el agua, y están especializadas en degradar las células epiteliales sin intervenir activamente en la degradación del sustrato. También tienen gran actividad proteasa y ureasa, mediante la cual intervienen en el reciclaje de urea proveniente del torrente sanguíneo (Cheng y Costerton, 1980).

2.4.2 Hongos

Los géneros más frecuentes en el rumen son *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Pyromyces* y *Orpinomyces* (Van Soest, 1982).

El hecho de que los hongos no predominen en el rumen se debe a su lento tiempo de generación en comparación con las bacterias, 6-9 contra 0.5-3.5 h, y su paso al duodeno, aunque no ha sido estimado, también debe ser muy bajo. En dietas forrajeras pueden representar el 8% de la masa microbiana, pero su número se reduce en dietas ricas en concentrado o en forrajes de alta calidad con tiempos de retención más cortos. Tienen actividad celulasa y hemicelulasa pero no pueden degradar la pectina y el ácido poligalacturónico. No hay evidencia de que degraden la lignina, pero sus rizoides la pueden penetrar y facilitar la degradación de la pared celular (Van Soest, 1982).

2.4.3 Protozoos

El número de protozoos es de 10^5 o 10^6 células/ml de contenido ruminal. Los protozoos pueden no estar presentes en el rumen o llegar a representar el 2% del peso del contenido ruminal, el 40% del nitrógeno microbiano total y proporcionar el 60% de los productos de fermentación microbiana (Rotger, 2004).

Aunque los protozoos constituyen una parte integral de la población microbiana y tienen un papel importante en la fermentación, su beneficio para los rumiantes sigue siendo controvertido. Algunos estudios han demostrado que los protozoos aumentan la digestibilidad ruminal y el rendimiento de los animales, mientras que

otros estudios no han observado ninguna diferencia entre animales defaunados y faunados. Ante esta aparente contradicción, otros autores han atribuido a los protozoos una función de estabilización de la fermentación, controlando el nivel de nutrientes y asegurando una fermentación más uniforme durante los periodos entre comidas, evitando así grandes fluctuaciones de pH (Orskov, 1992).

Las poblaciones microbianas descritas anteriormente interactúan en el ecosistema ruminal para maximizar la eficiencia de fermentación del alimento (Van Soest, 1982).

Los carbohidratos y la proteína son los principales sustratos fermentables para la población microbiana. De estos nutrientes obtendrán básicamente la energía y los compuestos nitrogenados para su crecimiento (Rotger, 2004).

2.4.4 Degradación de los carbohidratos

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para los microorganismos ruminales y el componente cuantitativamente más importante de la dieta de los ruminantes. Además de aportar energía a los microorganismos y al rumiante, se encargan de mantener el óptimo funcionamiento del rumen (Rotger, 2004).

Desde el punto de vista nutricional, se pueden clasificar en fibrosos que corresponden a la fibra neutro detergente (FND) y no fibrosos. Las únicas diferencias entre las dos clasificaciones son la pectina, que siendo carbohidratos estructurales no se incluye dentro de la FND del análisis y la lignina, que sin ser un carbohidrato, se encuentra íntimamente ligado a la pared celular y se incluye dentro de la fracción de FND (Van Soest, 1982).

- **Carbohidratos no fibrosos**

Son aquellos que desde el punto de vista del análisis químico no forman parte de la FND, y este grupo se compone de los carbohidratos de reserva de las plantas, azúcares solubles, pectinas y ácidos orgánicos.

- **Carbohidratos fibrosos**

La fibra vegetal está constituida por los carbohidratos estructurales de las plantas y es un agregado de componentes que no constituyen una entidad propia, pero que se entrelazan formando una misma macromolécula. Las microfibrillas de celulosa, que es el componente mayoritario de la pared, forman un entramado tridimensional, sobre una masa amorfa compuesta por hemicelulosa, pectina y lignina, y a la que frecuentemente se le asocian minerales y otros componentes. La lignina no es un carbohidrato, es un polímero fenólico localizado en la pared celular secundaria, pero se engloba dentro de este concepto por su estrecha relación con los carbohidratos estructurales (Van Soest, 1982)

La fibra se considera que agrupa los componentes de la pared celular, pero según el método de extracción utilizado agrupará distintos componentes, surgiendo las siguientes definiciones (Van Soest, 1982):

- Fibra neutro detergente: material insoluble en solución detergente neutra. Se compone de celulosa, hemicelulosa, lignina y puede contener residuos de almidón, cenizas y nitrógeno.
- Fibra ácido detergente: material insoluble en solución detergente ácida. Está constituida por celulosa y lignina, aunque puede contener residuos de nitrógeno y minerales.
- Fibra bruta: material insoluble en solución ácida, seguida por una alcalina, y está constituido por celulosa, aunque puede contener residuos de hemicelulosa, lignina y compuestos nitrogenados

La fibra se degrada lentamente, por lo que la adhesión de los microorganismos a la pared celular es el primer paso para iniciar su degradación, y para asegurar que los microorganismos permanecerán en el rumen el máximo tiempo, al asociarse a la parte más indigestible de la estructura vegetal. Esta adhesión puede ser vía uniones específicas con adhesinas (moléculas de la superficie microbiana que se une a receptores del material vegetal), o uniones inespecíficas con enlaces iónicos. Los primeros puntos de unión se localizan en los bordes de las partículas, en lesiones superficiales o en estomas. Debido a que la superficie externa de las estructuras vegetales suele estar recubierta por lignina, taninos, cutina y sílice que

dificultan el ataque microbiano, el proceso de degradación va de dentro hacia fuera (Rotger, 2004).

Los hongos son los únicos capaces de penetrar la cutina y la lignina, proporcionando nuevos sitios para la adhesión bacteriana, por lo que tienen una función importante en la degradación de la fibra. Las bacterias son las primeras en colonizar la estructura vegetal, siendo *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* las principales bacterias celulolíticas. Después de las bacterias se producirá la colonización por protozoos y hongos. Los zoosporos fúngicos detectan los azúcares solubles que difunden de las partes lesionadas de las estructuras vegetales, van hasta esta zona, se enquistan e invaden el tejido con sus rizoides. Un mecanismo similar de quimiostasis también se ha descrito en los protozoos. Los protozoos tienen gran actividad celulolítica y en determinadas condiciones, pueden representar más de la mitad de la actividad celulolítica del rumen (Rotger, 2004).

Una vez adheridos, se produce la degradación enzimática que consta de dos etapas. En la primera etapa, los polisacáridos complejos son hidrolizados hasta oligosacáridos de cadena corta y azúcares sencillos mediante las celulasas y hemicelulasas. En una segunda etapa, los monosacáridos son metabolizados hasta piruvato y finalmente hasta AGV, siendo el acetato el principal producto final de la degradación de los carbohidratos fibrosos (Rotger, 2004).

La actividad celulasa se realiza a través de un complejo enzimático que consta de tres enzimas (endoglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa) que trabajan sinérgicamente. Para degradar la hemicelulosa, también intervienen sinérgicamente más de una xilanasas. Al ser la fibra una mezcla tan heterogénea, sus componentes serán degradados en distinta intensidad por los microorganismos ruminales. Algunos componentes de la pared celular se degradarán rápidamente, mientras que otros prácticamente no se degradarán en el rumen y su degradación podrá continuar en el tracto gastrointestinal posterior antes de ser excretados en heces.

2.4.5 Degradación de las proteínas

Las proteínas son un nutriente esencial en la nutrición de todas las especies animales. En los rumiantes, el objetivo de la nutrición proteica es doble, por una parte satisfacer las necesidades de nitrógeno de los microorganismos ruminales, y por otra, aportar aminoácidos al animal. Las necesidades de los microorganismos se pueden cubrir con fuentes de nitrógeno proteico y no proteico, en cambio, las necesidades del animal sólo se pueden cubrir con aminoácidos, que pueden ser de origen dietario o microbiano. A diferencia de lo que pasa en los animales monogástricos, el perfil y la calidad de los aminoácidos que llega a duodeno es diferente del aportado en la ración, debido a la degradación ruminal de los aminoácidos dietarios y al aporte de proteína microbiana, sintetizada a partir de la energía derivada de los carbohidratos y de compuestos nitrogenados simples. Esta proteína microbiana junto con la proteína que escapa de la degradación ruminal es directamente disponible para ser digerida y absorbida por el rumiante (Rotger, 2004).

Dentro del grupo de taninos, los condensados de acuerdo con las reacciones que presenta con macromoléculas, en cualquiera de sus tipos, interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno, la formación de estos últimos depende del pH, por lo tanto este afecta las interacciones entre los taninos condensados y las proteínas. Por ejemplo, si el pH está entre 3.5 y 7.0, los complejos que se formarían entre taninos condensados serían estables e insolubles. Pero si el pH es mayor que 8 y menor que 3, estos complejos se esperaba que fueran inestables y solubles. Como consecuencia de ello, es decir, de la propiedad de los taninos condensados de reaccionar con las proteínas dependiendo del valor de pH, se infiere que de acuerdo con la cantidad de taninos condensados que utilicen, es posible reducir la solubilidad de la proteína y su degradabilidad en el rumen, para obtener una mayor eficiencia en la utilización del nitrógeno por los rumiantes por un incremento en el flujo de nitrógeno y en la absorción de aminoácidos a nivel del duodeno (Bernal, 2007). El complejo tanino-proteína se forma por los enlaces de hidrogeno entre los grupos fenólicos de los taninos y el grupo cetoamida de las proteínas, este proceso de formación es normalmente reversible y tanto las

proteínas como los taninos pueden recuperarse intactos. No obstante, si este complejo se pone en contacto con las condiciones de alcalinidad y presencia de oxígeno, los polifenoles pueden oxidarse a quinonas, y estas formar enlaces covalentes con aminoácidos nucleofílicos tales como la lisina, convirtiéndose en una asociación irreversible (Bernal, 2007).

Los factores que determinan este complejo son:

- Tamaño de la molécula
- Composición de aminoácidos
- Peso molecular de la proteína
- pH

Se plantea que a mayor tamaño de proteína y peso molecular hay tendencia marcada de establecer enlaces más fuertes con los taninos. Aunque cuando el tamaño de la molécula del tanino es grande pierde la posibilidad de enlazarse con la proteína por que se insolubiliza. Los taninos hidrolizables y condensables ligan proteínas, por ello en forrajeras de altos contenidos de taninos y proteína, la degradación de la proteína se reduce debido a la presencia de taninos, que tiene la capacidad de ligar enzimas digestivas que tiene como efecto inhibir su actividad digestiva, o a las proteínas de la dieta produciendo un complejo tanino-proteína menos digerible (Bernal, 2007).

2.5 Forraje verde hidropónico

El forraje verde hidropónico (FVH) es una tecnología de producción de biomasa vegetal obtenida a partir del crecimiento inicial de las plantas en los estados de germinación y crecimiento temprano de plántulas a partir de semillas viables. El FVH o “green fodder hydroponics” es un pienso o forraje vivo, de alta digestibilidad, calidad nutricional y muy apto para la alimentación animal (López-Aguilar y col., 2009)

En la práctica, el FVH consiste en la germinación de granos (semillas de cereales o de leguminosas) y su posterior crecimiento bajo condiciones ambientales

controladas (luz, temperatura y humedad) en ausencia del suelo. Usualmente se utilizan semillas de avena, cebada, maíz, trigo y sorgo (López-Aguilar y col., 2009).

La producción del FVH es tan solo una de las derivaciones prácticas que tiene el uso de la técnica de los cultivos sin suelo o hidroponía y se remonta al siglo XVII cuando el científico irlandés Robert Boyle (1627-1691) realizó los primeros experimentos de cultivos en agua (Rodríguez-Sánchez, 2003).

Pocos años después, sobre el final de dicha centuria, John Woodward produjo germinaciones de granos utilizando aguas de diferentes orígenes y comparó diferentes concentraciones de nutrientes para el riego de los granos así como la composición del forraje resultante (Rodríguez-Sánchez, 2003)

El proceso se realiza en recipientes planos y por un lapso de tiempo no mayor a los 12 o 15 días, realizándose riegos con agua hasta que los brotes alcancen un largo de 3 a 4 centímetros. A partir de ese momento se continúan los riegos con una solución nutritiva la cual tiene por finalidad aportar los elementos químicos necesarios (especialmente el nitrógeno) para el óptimo crecimiento del forraje, así como también el de otorgarle, entre otras características, su alta palatabilidad, buena digestibilidad y excelente sustituto del alimento concentrado (FAO, 2001).

El FVH es un sistema de producción de biomasa vegetal de alta sanidad y calidad nutricional producido muy rápidamente (9 a 15 días), en cualquier época del año y en cualquier localidad geográfica, siempre y cuando se establezcan las condiciones mínimas necesarias para ello. La tecnología FVH es complementaria y no competitiva a la producción convencional de forraje a partir de especies aptas (avena, mezclas de trébol y gramíneas, alfalfa, etc.) para cultivo forrajero convencional (FAO, 2001).

Dentro del contexto anterior, el FVH representa una alternativa de producción de forraje para la alimentación de corderos, cabras, terneros, vacas en ordeño, caballos de carrera; otros rumiantes; conejos, pollos, gallinas ponedoras, patos, cuyes y chinchillas entre otros animales domésticos y es especialmente útil durante períodos de escasez de forraje verde (FAO, 2001).

2.5.1 Ventajas del FVH

- *Ahorro de agua.* En el sistema de producción de FVH las pérdidas de agua por evapotranspiración, escurrimiento superficial e infiltración son mínimas al comparar con las condiciones de producción convencional en especies forrajeras, cuyas eficiencias varían entre 270 a 635 litros de agua por kg de materia seca. Alternativamente, la producción de 1 kilo de FVH requiere de 2 a 3 litros de agua con un porcentaje de materia seca que oscila, dependiendo de la especie forrajera, entre un 12 a 18%. Esto se traduce en un consumo total de 15 a 20 litros de agua por kilogramo de materia seca obtenida en 14 días (Ruiz, 1999).
- *Eficiencia en el uso del espacio.* El sistema de producción de FVH puede ser instalado en forma modular en la dimensión vertical lo que optimiza el uso del espacio útil (Elizondo, 2005).
- *Eficiencia en el tiempo de producción.* La producción de FVH apta para alimentación animal tiene un ciclo de 10 a 12 días. En ciertos casos, por estrategia de manejo interno de los establecimientos, la cosecha se realiza a los 14 o 15 días, a pesar que el óptimo definido por varios estudios científicos, no puede extenderse más allá del día 12 (Ruiz, 1999).
- *Calidad del forraje para los animales.* En general el grano contiene una energía digestible algo superior (3.3 kcal/kg) que el FVH (3.2 kcal/kg). Sin embargo, los valores reportados de energía digestible en FVH son ampliamente variables. En el caso particular de la cebada el FVH se aproxima a los valores encontrados para el concentrado especialmente por su alto valor energético y apropiado nivel de digestibilidad (Elizondo, 2005).
- *Costos de producción.* Las inversiones necesarias para producir FVH dependerán del nivel y de la escala de producción. El análisis de costos de producción de FVH, revela que considerando los riesgos de sequías, otros fenómenos climáticos adversos, las pérdidas de animales y los costos unitarios del insumo básico (semilla) el FVH es una alternativa económicamente viable que merece ser considerada por los pequeños y medianos productores. Al no requerir de maquinaria agrícola para su siembra y cosecha, el descenso de la

inversión resulta evidente. Investigaciones recientes sostienen que la rentabilidad de la producción del FVH es lo suficientemente aceptable como para mejorar las condiciones de calidad de vida del productor con su familia, favoreciendo de este modo su desarrollo e inserción social, a la vez de ir logrando una paulatina reconversión económica-productiva del predio (FAO, 2001).

III. ANTECEDENTES

3.1 Elicitores

Han sido diversos los estudios que se han realizado con elicitores, entre ellos podemos mencionar los siguientes.

Uchida y col. (2002) encontraron que el tratamiento de las plántulas de arroz con niveles bajos (<10 mM) de H_2O_2 y ON, permite el desarrollo de hojas más verdes y con mayor rendimiento para el fotosistema II, un mayor contenido de sal y mayor resistencia de las plántulas al calor. También se demostró que el tratamiento induce no sólo a la activación de las enzimas eliminadoras de oxígeno activo, sino también a la expresión de las transcripciones de los genes relacionados con el estrés, que codifican la sacarosa-fosfato, Δ' -pirrolina-5-carboxilato sintasa. Estos resultados sugieren que el H_2O_2 y ON pueden aumentar tanto la tolerancia a la sal como al calor en las plántulas de arroz, al actuar como moléculas señalizadoras.

Mora-Herrera y col. (2005) estudiaron los efectos del ácido salicílico (AS) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en la tolerancia a bajas temperaturas de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum*), Alfa y Atlántico, donde la Alfa es más tolerante que la Atlántico. Se aplicaron dosis de 0.1 mM de AS y 5 mM de H_2O_2 en cultivo *in vitro* a las 24 h de trasladarse del cultivo *in vitro* al suelo. Las plantas se expusieron a 6°C durante 4 h en la oscuridad y se estimaron la actividad de la catalasa y del H_2O_2 en los siguientes puntos de la cosecha: etapa (a) a las 4 semanas del traslado del cultivo *in vitro* al suelo. Etapa (b) a las 24 h del traslado del cultivo *in vitro* al suelo, justo antes de la exposición al frío. Etapa (c) a las 15 días del traslado del cultivo *in vitro* al suelo.

Se encontró que el AS no siempre conduce a la acumulación de H_2O_2 , a pesar de que las actividades de catalasa y peroxidasa disminuyeron como resultado del tratamiento. Por otra parte, la acumulación de H_2O_2 no siempre se asocia con la inducción de la tolerancia a las bajas temperaturas. Por ejemplo, en la etapa (a), la

tolerancia inducida por ASen Alfa no fue acompañada por la acumulación de H_2O_2 . El H_2O_2 fue capaz de inducir tolerancia a las bajas temperaturas sólo en Atlántico, a pesar de haber peróxido acumulado en ambos cultivares después de este tratamiento. Las tasas de supervivencia más baja de congelación se observaron en las plantas de 4 semanas de edad.

Tierranegra García y col. (2011) evaluaron el efecto de aplicar de manera foliar, AS y jasmonato de metilo (JaMe), en plantas de lechuga contra el ataque de cochinillas (*Armadiidium vulgare*). Se hicieron aplicaciones foliares de AS y JaMe, en intervalos semanales a partir de la germinación de la planta y hasta una semana antes de la cosecha. AS y JaMe indujeron niveles detectables de H_2O_2 durante 5 días después de la aplicación en las plantas a lo largo de su cultivo. También se encontró que el AS y JaMe, en las concentraciones y esquema de aplicación evaluados en esta investigación, no influyeron significativamente en el peso seco y fresco de las plantas, en la clorofila y nitrato contenido. Pero sobre todo, ambos elicitors disminuyeron la mortandad de lechuga debido a la cochinilla, lo cual se correlacionó positivamente con los compuestos fenólicos y los flavonoides contenidos

Landeta-Riverol (2011) realizó una investigación para evaluar el efecto de la aplicación foliar del peróxido de hidrógeno sobre la pungencia del chile habanero (*Capsicum chinense* Jack) de la variedad Chichen Itzá bajo condiciones de invernadero. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con cuatro niveles de peróxido de hidrógeno: 0, 6, 14 y 18 mM; con seis repeticiones y como unidad experimental seis plantas por tratamiento, 144 plantas el total a muestrear para cada variable. Se evaluaron la altura de planta, diámetro en la base del tallo, número de frutos peso de fruto, contenido de clorofila SPAD, capsaicina y dihidrocapsaicina en cada tratamiento. La pungencia fue determinada en cantidad de capsaicina y dihidrocapsaicina (g/g), así como en Unidades de Pungencia Scoville (SHU). Como resultado se encontraron diferencias significativas en los cuatro niveles de peróxido de hidrógeno, la concentración mayor de capsaicina y dihidrocapsaicina se encontró en el tratamiento 18 mM con (35 mg/g de peso

seco). En el contenido de clorofila el tratamiento que presentó mayor nivel fue 18 mM con 74 Unidades SPAD. Los resultados muestran que al ser elicidadas de forma foliar las plantas de chile habanero con las concentraciones de 18 mM de peróxido de hidrógeno se produce un aumento en la concentración de capsaicina, dihidrocapsaicina, clorofila y esto tiene una relación con el crecimiento y desarrollo de la planta.

Mejía-Teniente y col. (2013) evaluaron la producción de H_2O_2 endógeno causado por los elicitores AS, quitosán(QN) y H_2O_2 en chile pimienta (*Capsicum annum* L.). Se determinaron la producción de H_2O_2 endógeno, la actividad de la CAT y la de la fenilalanina amonio liasa (PAL), así como el análisis de la expresión genética de *cat1* y la proteína relacionada con la patogénesis -1 PR1. Como resultado, obtuvieron que las concentraciones de 6.7 y 10 mM de AS, y las de 14 y 18 mM de H_2O_2 , indujeron una producción de H_2O_2 endógeno y la expresión génica. Los tratamientos de QN indujeron las mismas respuestas pero en menor proporción que los otros dos elicitores.

3.2 Emisión de metano

El metano (CH_4) es un producto final de la fermentación que sufren los alimentos en el rumen, que en términos de energía constituye una pérdida y en términos ambientales contribuye al calentamiento y al cambio climático global. La investigación en nutrición animal se ha enfocado en su mayor parte a encontrar métodos para reducir las emisiones de CH_4 debido a la ineficiencia energética que ocurre en el rumen, y no por el rol del CH_4 en el calentamiento global. Sin embargo, recientemente se ha prestado más atención a su contribución potencial al cambio climático (Bonilla y Lemus, 2012).

El CH_4 pertenece al grupo de gases de efecto invernadero (GEI), en el que se encuentran también: bióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O), hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos, (PFC) y hexafluoruro de azufre (SF_6). Todos estos gases tienen moléculas con dos o más átomos que se mantienen unidos con suficiente espacio entre sí para poder vibrar cuando absorben calor; eventualmente la molécula que vibra libera radiación y ésta será

posiblemente absorbida por otra molécula de GEI. A este proceso de mantener calor cerca de la superficie de la tierra, se le conoce como efecto invernadero. Los GEI son liberados a la atmósfera tanto por fuentes naturales como antropogénicas. La cantidad de GEI liberados mediante la actividad humana se ha incrementado de manera significativa en los últimos años, lo cual está propiciando la amplificación del efecto invernadero natural y el cambio climático global. La agricultura y la producción pecuaria contribuyen ampliamente a las emisiones antropogénicas de CH₄, CO₂ y N₂O a la atmósfera. Por estos motivos se están encaminando esfuerzos a reducir las emisiones y prevenir el calentamiento global, y proteger así el sistema climático natural del planeta, y se considera que los sistemas de producción animal sostenibles deben tender a una menor producción de CH₄ (Bonilla y Lemus, 2012).

La producción de CH₄ en los rumiantes está influenciada por factores como el consumo de alimento, composición de la dieta, digestibilidad del alimento, procesamiento previo del alimento y frecuencia de alimentación. Entre las estrategias para mitigar las emisiones de CH₄ se ha propuesto: reducir el número de animales rumiantes, aumentar el número de animales no rumiantes, manipulación genética de los microorganismos ruminales metanogénicos, desarrollo de razas menos metanogénicas y manipulación dietética-nutricional. Esta última parece ser la de mayor potencial en términos de simplicidad y factibilidad. La manipulación nutricional para suprimir la metanogénesis incluye uso de forrajes de alta calidad, alta proporción de granos en la dieta, uso de aditivos (compuestos químicos, ácidos orgánicos, ionóforos, probióticos), dietas ricas en ácidos grasos insaturados, adición de acetógenos, de bacteriocinasas, de virus vs Archaea, y de extractos vegetales (aceites esenciales), modificación de las prácticas de alimentación y suplementación a dietas basadas en pajas. Estas prácticas de alimentación reducen las emisiones de CH₄ debido a que modifican la fermentación ruminal, inhibiendo directamente los metanogénicos y protozoarios, o desviando los iones hidrógeno de los metanogénicos (Bonilla y Lemus, 2012).

3.2.1 Microorganismos metanogénicos

El CH₄ es producido en el rumen por un grupo altamente especializado de microorganismos, los cuales son anaerobios obligados. La producción de CH₄ por estos microorganismos es parte de su metabolismo energético, y la mayoría utilizan CO₂ como su aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica, convirtiéndolo a CH₄; el donador de electrones utilizado en este proceso es generalmente el H₂. Las condiciones anaerobias, la ausencia de luz y la presencia de NO₃, S y SO₄ que caracterizan la fermentación de materia orgánica (MO), conducen a la biogénesis de CH₄. El CH₄ es producido por microorganismos pertenecientes al dominio Archaea, que comprende dos reinos: *Euryarchaeota* (metanogénicos, halófilos extremos y algunos hipertermófilos) y *Crenarchaeota* (originalmente sólo comprendía a los hipertermófilos pero ahora incluye una variedad de miembros no termofílicos. Anteriormente se consideraba que los microorganismos metanogénicos pertenecían al dominio Bacteria (Bonilla y Lemus, 2012).

A pesar de su diversidad morfológica (diferentes formas y estructuras celulares) todos los aislados puros de microorganismos metanogénicos son únicos debido a que usan sustancias simples para obtener energía y crecer, así como su habilidad para producir CH₄. Debido a la gran diversidad de estructuras orgánicas presentes en la biomasa ruminal, se requiere de un amplio grupo de microorganismos para su fermentación además de los metanogénicos, ya que estos sólo catabolizan un limitado número de sustratos. Así, el complejo de microorganismos convierte los carbohidratos, proteínas y lípidos en fragmentos de menor peso molecular que son utilizados por bacterias acetógenicas (productoras de hidrógeno) para formar acetato, hidrógeno y CO₂, los cuales son utilizados por los microorganismos metanogénicos (Bonilla y Lemus, 2012).

3.2.2 Alternativas para la reducción de metano emitido por rumiantes

Como se ha mencionado, existen numerosos factores que afectan la producción de CH₄, por lo que las alternativas para reducirlo pueden orientarse a uno de los

factores, a un grupo de estos, o a implementar todo un conjunto de medidas para su control, lo que dependerá en gran parte de las condiciones de producción. El mejoramiento de las características nutricionales del forraje y la implementación de sistemas estratégicos de suplementación, así como la presencia de otros estratos vegetales en el área de pastoreo (sistemas silvopastoriles), pueden mejorar las características de la fermentación ruminal, reflejándose en mayor productividad y generalmente en una disminución en las emisiones de CH₄ (Bonilla y Lemus, 2012).

3.2.3 Aditivos al alimento.

Recientemente se han destacado cuatro objetivos principales al usar aditivos para optimizar la función ruminal: 1) reducir la producción de CH₄ a favor del propionato para mejorar el balance energético de los animales, 2) disminuir la degradación de las proteínas para incrementar la biodisponibilidad de aminoácidos en el intestino delgado, 3) reducir la tasa de degradación de los carbohidratos rápidamente fermentables (almidón, sacarosa) y controlar la concentración de ácido láctico, y 4) mejorar la digestión de la fibra (Bonilla y Lemus, 2012).

- *Grasas animales.* La inclusión de sebo de res (34 g de grasa kg MS⁻¹) en dietas con base en ensilado de cebada para vaquillas Angus en crecimiento, redujo en 14% la emisión de CH₄, sin reducir el consumo de alimento, pero sí la digestibilidad de la FDN en el tracto total (-15 %), comparado con la dieta testigo. La adición de 3% de lípidos a dietas altas en forrajes disminuye la emisión de CH₄ y podría tener efecto sustancial en los inventarios de CH₄ si se adopta a nivel comercial, pero habrán de elegirse aquellas fuentes de grasas que tengan potencial de aplicación en campo, ya que aunque el sebo y las semillas de girasol sean de menor costo que el aceite de girasol, su efectividad como estrategia para abatir las emisiones debe tener también en cuenta los efectos potencialmente negativos en el consumo de energía digestible y en el comportamiento de ganado alimentado con dietas altas en forrajes (Bonilla y Lemus, 2012).

- *Metabolitos secundarios*. Estos incluyen a las saponinas, terpenoides, fenoles, glucósidos, taninos, ligninas, alcaloides, polisacáridos y aceites esenciales. La especificidad de los metabolitos secundarios de los vegetales contra grupos microbianos puede utilizarse para la inhibición selectiva de algunos microbios indeseables en el rumen (Bonilla y Lemus, 2012).

Debido a acuerdos internacionales como los protocolos de Montreal y de Kyoto, así como a la existencia de organizaciones gubernamentales y no gubernamentales en todo el mundo, muchos países están realizando acciones encaminadas al control (mitigación) de las emisiones de GEI. La primera acción es determinar el inventario de GEI que cada país emite considerando sus diversas actividades socio-económicas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Gases de efecto invernadero en México, por tipo de gas y por sector (gigagramos de equivalentes de CO₂).

	AÑO Y PORCENTAJE					
	1996	%	2002	%	2006	%
TOTAL DE EMISIONES	686 000	100	643 183	100	711 650	100
CO ₂	514 047	75	480 409	74	492 862	69.3
CH ₄	157 648	23	145 586	23	188 036	26.4
NO ₂	14 442	2	12 343	2	20 511	2
ENERGÍA	364 189	53	389 497	61	430 097	60.4
USCUSS	157 000	22.9	65 584	10	102 173	14.4
DESECHOS	61 710	9	89 854	14	70 203	9.9
AGRICULTURA	55 674	8.1	52 102	8	63 526	8.9
PROCESOS INDUSTRIALES	43 121	6.3	46 146	7	45 552	6.4

Fuente: Bonilla y Lemus, 2012.

Jouany y Morgavi (2007) realizaron una revisión acerca de los aditivos no antibióticos más comunes o que podrían ser utilizados en la alimentación de ruminantes. Se presentan probióticos, ácidos dicarboxílicos, enzimas y productos derivados de plantas incluyendo saponinas, taninos y aceites esenciales. Se describen los modos de acción conocidos y los efectos de estos aditivos sobre la digestión y fermentación en el rumen. También se discute su utilidad y las

limitaciones en las condiciones de campo de los sistemas de producción de rumiantes y su cumplimiento de la legislación vigente.

Vargas y col. (2012), explora el conocimiento asociado a los aspectos que determinan la emisión de metano en rumiantes en pastoreo. Se aborda el efecto de la especie forrajera, variedades dentro de especies y asociaciones gramínea/leguminosa, además de aspectos de manejo de la pastura como su madurez, carga animal, sistema de pastoreo y nivel de fertilización. El análisis hace énfasis en las influencias en las emisiones por unidad de materia seca consumida. Existen diferencias entre especies forrajeras en la emisión de metano que están asociadas a diferencias en las concentraciones de fibra, a variaciones en la tasa de paso y la presencia de metabolitos secundarios. Mayores concentraciones de fibra reducen las tasas de paso, el consumo de materia seca y aumenta la producción de metano por unidad de materia seca consumida. El efecto de la inclusión de leguminosas sobre la producción de metano es variable y está influenciado por la presencia de metabolitos secundarios como los taninos y las saponinas. Los resultados de los trabajos revisados sugieren que existen oportunidades para reducir las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida cuando las prácticas de manejo de las pasturas aumenten las tasas de paso y el consumo voluntario. Además el aumento en el consumo conllevaría a la reducción de emisiones de metano por unidad de producto animal.

3.3 Taninos

Los taninos condensados (TC) de las plantas reducen la metanogénesis ruminal mediante la disminución de la formación de hidrógeno e inhibición de los microorganismos metanogénicos (Bonilla y Lemus, 2012).

Patra y col. (2006) encontraron una disminución en la producción de CH₄ (39.6 l kg de MS digestible contra 52.1 del testigo) al incluir *Terminalia chebula* en dietas de paja de trigo más concentrado en una proporción 1:1, por lo que esta especie parece tener potencial de uso como aditivo para mejorar la digestibilidad y reducir

las emisiones entéricas de CH₄ en rumiantes, debido a la presencia de alta concentración de compuestos fenólicos.

Longo y col. (2006) realizaron una evaluación *in vitro* de la adición de especies taniníferas (*Stylobolium aterrimum*, *S. derringiatum*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa caesalpiniaefolia*), y *Cynodon* como testigo, conteniendo: 20, 54, 66, 105 y 0.2 g de TC/kg de MS, respectivamente, dando como resultado que al tiempo medio de la máxima producción de gas, el CH₄ se redujo en 17% con la adición de leguminosas. Cuando se relacionó con la degradabilidad verdadera del sustrato la reducción promedió 50% con *Leucaena* y *S. aterrimum* y en 25% con *S. derringiatum* y *M. caesalpiniaefolia*. En general, las plantas taniníferas fueron capaces de reducir el CH₄ entérico, con diferentes proporciones en los productos de la fermentación, sin embargo, sólo *Leucaena* y *S. aterrimum* pudieron contribuir a incrementar la producción animal con mayor eficiencia.

Tiemann y col. (2006), describen que los taninos pueden tener efectos positivos sobre el aprovechamiento de las proteínas y la reducción en la emisión de metano de rumiantes ya que se determinaron mayores volúmenes de gas en los tratamientos con nutrición que contenían baja cantidad de taninos y menores volúmenes en los tratamientos con alta cantidad de taninos; sin embargo, se observó que la digestibilidad *in vitro* se redujo con cualquier adición de taninos.

Ramírez y col. (2007) encontraron menor producción de CH₄ en ovinos alimentados con bloques de forraje que contenían pequeños trozos de *Salix spp*, que en ovinos en pastoreo de *Lolium perenne* y *Trifolium repens*: 25.4 contra 31.0 g/animal/día, respectivamente, después de cinco semanas de pastoreo, atribuyendo la reducción a la presencia de TC y de otros compuestos fenólicos en los arbustos de *Salix spp*.

Bernal (2007), evaluó el efecto de mezclar leguminosas *Calliandra calothyrsys*, *Flemingia crophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata*, ensiladas y henificadas sobre parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y producción de leche en bovinos. Como resultados obtuvo que la mayor producción de gas a las

144 horas de incubación, las degradabilidades de materia seca y proteína, y la concentración de amonio fue para las leguminosas *Vigna unguiculata* y *Cratylia argentea* respectivamente, las cuales se caracterizan por carecer de taninos condensados, contrario esto los más bajos registros se reportaron para las especies taníferas *Callindra calotrysus* y *Fleminigiama crophyla*.

Vasta y col. (2009) llevaron a cabo un experimento para evaluar el efecto de la suplementación de la dieta de alimentación, con taninos, en el metabolismo de ácidos grasos, el fluido rumial y la grasa intermuscular en ovejas. Dentro de cada tratamiento, la mitad de los ovejas recibió suplementos de polvo de quebracho, proporcionando el 4.0% de taninos de la MS de la dieta. Se recogieron muestras de sangre. Los animales fueron sacrificados a los 105 días de edad, y se recogió contenido ruminal antes de ser sacrificados. La composición de ácidos se determinó por cromatografía de gases. Los resultados que obtuvieron indican que los taninos reducen la biohidrogenación ruminal. La suplementación con taninos (4% de la MS) redujo la acumulación de ácidos grasos saturados en la sangre, comparada con las dietas libres de taninos. Esto implica que la administración de suplementos de taninos podría ser una estrategia útil para aumentar el ácido ruménico y reducir el contenido de ácidos grasos saturados en la carne de los rumiantes. Sin embargo, la concentración correcta de taninos en la dieta, debe elegirse cuidadosamente para evitar efectos negativos en la salud y productividad de los animales.

Gurbuz (2009) estudio los efectos de taninos condensados en la formación de gas metano, gas total, y ácidos grasos volátiles en algunas especies de leguminosas forrajeras. Hubo diferencias significativas entre las especies de leguminosas en cuanto a los taninos condensados. Los contenidos de taninos condensados de *Coronilla orientalis* (CO), *Coronilla parviflora* (CPW), *Dorycnium pentaphyllum* (DP), *Arygrobium* (A), *Lotus corniculatus* Trabzon (LCT), *Lotus langustissimus* (LA) y *Lotus corniculatus vartenofolius* (LCV) fueron de 3.78, 103.78, 18.41, 0.75, 22.19, 55.58, y 8.97 mg/kg materia seca, respectivamente. De la misma forma, el metano acumulado, el dióxido de carbono, y el volumen total de gas (ml/1.0 g

materia seca) a las 144 h fueron mayores para *Lotus corniculatus vartenofolius* (27.98 ml, 210.94 ml, 270.00 ml). El metano, el dióxido de carbono, y el volumen total de gas (ml/1.0 g materia seca) a las 144 h fueron menores para *Dorycnium pentaphyllum* (15.07 ml, 132.00 ml, 190.50 ml, respectivamente). El contenido de taninos condensados en leguminosas disminuyó la producción de gas total, de metano, y de dióxido de carbono en todas las especies de leguminosas forrajeras. Sin embargo, hubo diferencias en la concentración de amoníaco, i-butírico (i-B) n-butírico (n-B), n-valérico (n-V), i-valérico (i-V), en el fluido fermentado, y la proporción acetato-propionato se vio afectada en todas las leguminosas forrajeras ($P < 0.01$). La proteína bruta osciló, como promedio, desde 13.2 hasta 19.3 % de la materia seca. Los contenidos de fibra neutro detergente y lignina ácido detergente oscilaron entre 33.17 y 46.64 % de materia seca y entre 29.51 y 43.16 % de materia seca, respectivamente. Los valores más bajos correspondieron a *Lotus corniculatus*, y los más altos a *Dorycnium pentaphyllum*, cosechados en la etapa de floración. Los resultados indican que el contenido de taninos condensados en la producción de metano puede decrecer por efectos indirectos mediante la vía de la producción reducida de hidrógeno (y presumiblemente la digestibilidad de forraje reducida) y mediante la vía directa de efectos inhibidores en la metanogénesis.

3.4 Producción de FVH

La producción de forraje verde hidropónico (FVH) es una técnica para producir alimento vivo para el ganado, adecuado para mitigar las principales dificultades encontradas en zonas áridas y semiáridas. (Álvarez-Aguirre, 2009).

Navarrete (2008), realizó una investigación en la cual se evaluaron tres cortes en dos gramíneas, cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*) y una leguminosa, vicia (*Vicia* sp.) para forraje verde hidropónico y su incidencia en el incremento de la producción y contenido nutricional. Las variables de estudio fueron: días y porcentaje de germinación, altura al primer corte, rendimiento, contenido de proteína y análisis económico para los tratamientos. Los mejores

resultados en cuanto a días y porcentaje de germinación, altura y rendimiento los obtuvieron los tratamientos conformados por cebada, en cuanto al contenido de proteína y rentabilidad se obtuvieron diferencias altamente significativas para la vicia.

Álvarez-Aguirre (2009) realizó una investigación donde se evaluaron tres especies de forrajes bajo condiciones de invernadero, Trigo (*Triticum*), Avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum vulgare*), con el objetivo de determinar su producción bajo tres esquemas de nutrición: solución nutritiva estándar (200 ppm de nitrógeno), solución orgánica a base de humus líquido de lombriz al 50% (100 ppm de nitrógeno), y solución combinada de 200 ppm de nitrógeno del humus de lombriz más elementos químicos (Ca, P, Fe, Cu) para complementar la dosis. Las variables de estudio fueron la altura de planta, biomasa y proteína digestible. La toma de datos se realizó en a los 4, 8y 11 días después de la germinación (ddg) de la semilla. Las alturas de planta mayores fueron obtenidas con la cebada y nutrición orgánica-química con una media de 19.4 cm, mientras que la producción de biomasa fue mayor en avena con nutrición química con 4.8 kg/m². El mayor contenido de proteína digestible fue para la cebada con nutrición química con un valor medio de 19%. Se concluye que esta técnica de producción es una alternativa para la nutrición animal.

Romero y col. (2009), precisó la técnica de producción FVH y su aceptación en ganado lechero. La producción se realizó en un invernadero con capacidad para 1440 charolas de 40 x 60 cm. La semilla de cebada y las charolas se desinfectaron, luego se mezcló paja de trigo con el grano de cebada, esa mezcla se ubicó en charolas que se colocaron inclinadas en estantes verticales. Las charolas se regaron por goteo, dos minutos cada dos horas. La producción obtenida a los ocho días fue de 3.8 kg de FVH por charola y el costo del kg de FVH fue de \$ 1.09. A las vacas en producción se les ofreció 4.5 kg de FVH mezclados con otros alimentos sin presentarse problemas de rechazo. Se concluye que la técnica

empleada es adecuada para obtener una buena producción de FVH que no es rechazada por el ganado lechero.

Soto y col. (2012) estimaron la producción de biomasa y el valor nutricional de forraje verde hidropónico de trigo y avena. Se determinó la composición química (MS, PC, EE, FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa, lignina), producción de gas *in vitro*, energía metabolizable (EM), degradabilidad *in situ* de MS y PC, digestibilidad verdadera *in vitro* de MO y proteína metabolizable (PM). Los datos se sometieron a análisis de varianza para un diseño factorial 3x2x2 (tres densidades de siembra, dos especies y dos fechas de cosecha). Los promedios generales de las variables evaluadas en ambas especies, como producción de biomasa (13 kg FVH/m²), contenido de proteína (15.6%, base MS), producción de gas a partir de la fracción lentamente fermentable (57ml/200mg MS), tasa constante de producción de gas (5.8%/h), contenido de EM (2.5Mcal·kg⁻¹ MS) y contenido de proteína metabolizable (73g·kg⁻¹ MS), indican alta disponibilidad de nutrientes y energía. El costo de producción del FVH de trigo (2.29 pesos mexicanos/kg MS) es 82% del costo de 1kg de semilla de trigo original, lo cual reduce el costo de alimentación de rumiantes. Las variables nutricionales evaluadas indican que el FVH ofrece buena calidad nutritiva para rumiantes.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de la aplicación de peróxido de hidrógeno en la calidad nutracéutica, digestibilidad y producción de gas *in vitro* del forraje verde hidropónico.

4.1.1 Objetivos particulares

- Implementar un sistema de producción de forraje verde hidropónico.
- Determinar el efecto de la aplicación del peróxido de hidrogeno en la calidad nutraceútica del forraje verde hidropónico.
- Determinar el efecto de la aplicación de peróxido de hidrógeno en la digestibilidad y producción de gas *in vitro* del forraje verde hidropónico.

4.2 Hipótesis

- La aplicación del peróxido de hidrogeno aumenta la calidad del forraje verde hidropónico.

V. METODOLOGÍA

La metodología para la producción del FVH que se utilizó es la recomendada por la FAO (2001). La producción del FVH se realizó en el campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería, las pruebas analíticas se llevaron a cabo en los laboratorios de nutrición animal de la facultad de Ciencias Naturales y de virología de la facultad de Ingeniería en los campus Juriquilla y Aeropuerto, respectivamente, pertenecientes a la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.1 Diseño de tratamientos

Se estudiaron tres niveles de concentración de peróxido de hidrogeno aplicado de dos maneras diferentes, la primera fue por imbibición y la segunda por aspersado. Lo anterior más el control da un total de siete tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentración de H₂O₂ para los distintos tratamientos.

Tipo de uso	Tratamiento	Concentración
Imbibición	1	05 mM
	2	10 mM
	3	20 mM
Testigo	4	00 mM
Aspersión	5	05 mM
	6	10 mM
	7	20 mM
Total	7 tratamientos	

Se realizaron 3 repeticiones por cada tratamiento, lo que da un total de 21 unidades experimentales. El experimento se repitió tres veces.

5.2 Material vegetal

Se utilizó semilla de cebada (*Hordeum vulgare* L.), la cual se obtuvo de la facultad de Ciencias Naturales-UAQ-campus Amazcala.

5.3 Acondicionamiento del invernadero

Se limpió y acondicionó, según las necesidades del diseño de tratamientos del experimento, un invernadero de 45 m² de forma gótica, con plástico para invernadero difuso de 150 micrones, en la superficie de la parte del techo tiene malla sombra al 50%. Se colocó malla antiáfidos en las paredes para mantener la sanidad dentro de éste (Figura 5).



Figura 5. Invernadero utilizado en el campus Amazcala, FI UAQ.

El invernadero que se utilizó tiene un sistema de riego con dos bombas de 1/2 hp y aspersores con un gasto de 40 l/h. Como contenedor de agua cuenta con dos tinacos de 1100 l y tubos de PVC de 2" para conducir el agua. Se contó con raquets para sostener las charolas de forraje verde hidropónico de 6 m de largo X 1.20 m de ancho con cuatro entrepaños con una separación de 50 cm entre éstos (Figura 6).



Figura 6. Raquets para sostener FVH dentro del invernadero.

5.4 Limpieza de semilla.

Se limpió la semilla de cebada, eliminando cualquier residuo, basura, paja, semilla quebrada, etc. Se utilizó una canasta en la cual se puso la semilla, se agitó y los residuos o basura se eliminaron (Figura 7).



Figura 7. Limpieza de semilla.

5.5 Manufactura de costales

Para la desinfección de la semilla, ésta se colocó en costales de tela para evitar la pérdida de ella. Se cortaron trozos de tela a una medida de 35 cm X 35 cm aproximadamente. Se colocaron en cada costal de tela 300 g de semilla de cebada limpia y se amarraron con la rafia(Figura 8).



Figura 8. Pesaje de la semilla de cebada.

5.6 Desinfección de la semilla

Se introdujo cada costal de tela en una tina con 30 L de agua más 300 ml de hipoclorito de sodio al 1% para remojarlas durante 1.5 min, a manera de desinfección (Figura 9).



Figura 9. Desinfección de la semilla.

5.7 Imbibición

Se prepararon 5 botes, de los cuales 3 contenían peróxido de hidrogeno y agua des-ionizada a las concentraciones de peróxido ya mencionadas (Cuadro 3), se sumergieron 3 costales en cada bote y el resto de los costales se sumergieron en los 2 botes restantes, los cuales contenían sólo agua.

Los 3 botes con peróxido de hidrogeno corresponden a los tratamientos 1, 2, y 3, los botes que contenían sólo agua corresponden a los tratamientos 4, 5, 6 y 7 (Figura 10).

Se mantuvieron así por un periodo de 12 h. Una vez pasado este tiempo, se sacaron los costales de tela del agua y se colgaron durante 1 h, posteriormente se remojaron nuevamente por otras 12 h en sus botes correspondientes.



Figura 10. Uso del peróxido de hidrogeno en la imbibición.

5.8 Charolas

Se utilizaron charolas especiales para la producción de FVH con las siguientes medidas: 24.8 cm de ancho X 54.8 cm de largo. Se les colocó un tamiz de tela de organza lisa a fin de contener la semilla y como drenaje. Se desinfectaron con una solución de sales cuaternarias de amonio de 2.5 ml/l (Figura 11).



Figura 11. Charolas para producir FVH en el campus Amazcala, FI UAQ.

5.9 Germinación

Se extendió la semilla de cada costal dentro de cada charola. Posteriormente las semillas se cubrieron con plástico negro por un periodo de cuatro días. Se retiró el plástico pasado el periodo de germinación (Figura 12).



Figura 12. Germinación de la semilla.

5.10 Desarrollo del cultivo

El cultivo se mantuvo durante 8 días, los riegos desde el primer día hasta la cosecha se hicieron a partir de las 7:00 hasta las 19:00 h, cada media hora y con una duración de un minuto por riego (Figura 13).



Figura 13. Desarrollo del cultivo de FVH de cebada.

El primer y cuarto día se aplicaron 150 ml de peróxido de hidrogeno en las concentraciones mencionadas (Cuadro 3), a las charolas que contenían las semillas de los tratamientos 5, 6 y 7 respectivamente (Figura 14).



Figura 14. Aplicación de peróxido de hidrógeno de manera foliar a los tratamientos.

5.11 Cosecha

Se obtuvo un tapete radicular a los 8 días post-germinación. Se pesó el contenido de las charolas para determinar la masa húmeda (kg de forraje por charola), para ello se levantó el tapete de la charola y se pesó en una báscula digital. la altura del FVH se determinó tomando 5 medidas en cada charola y realizando el promedio de ellas; las mediciones se hicieron con una regla. Se introdujo el contenido de FVH de cada charola en bolsas y se guardaron en un congelador etiquetadas (Figura 15). El porcentaje de humedad se obtuvo con la relación del peso de masa húmeda y el de masa seca.



Figura 15. Pesaje de charolas el día de cosecha.

5.12 Pruebas de laboratorio

Las muestras se sometieron a un proceso de secado a 60°C durante 48 h y adicionalmente se pusieron al sol durante 3 h, de 12:00 pm a 3:00 pm. Posteriormente se molieron en un molino de cizallas PULVEX con una criba de 1 mm y se llevaron a cabo las pruebas descritas a continuación.



Figura 16. Molienda de muestras en molino PULVEX con criba de 1 mm.

5.12.1 Metabolitos secundarios

Para la determinación de los metabolitos secundarios, primero se prepararon los extractos metanólicos de acuerdo a la descripción de Cardador-Martínez y col. (2002). Se mezcló 1 g de muestra MS con 10 ml de MeOH, se disolvieron colocándolos en un vortex durante 24 h, posteriormente se dejaron en reposo 12 h y se centrifugaron durante 10 minutos.

5.12.1.1 Taninos

Para la determinación de taninos condensados se utilizó la técnica descrita por Deshpande y Cheryan (1987) modificada para su uso en microplaca. Se realizó la curva de calibración con un rango de (0.1-0.8mg/ml de (+)-catequina equivalente. Los taninos condensados (TC) se expresaron como equivalentes de (+)-catequina en miligramos por gramo de muestra fresca (mg de TC/g). Brevemente, 200 µl de reactivo de vainillina (1% de vainillina, 8% de HCl en metanol) se añadieron a 50 µl de extracto metanólico (1 g de muestra se extrajo

en 10 ml de metanol) y se colocaron en una placa de 96 pocillos; cada muestra se realizó por triplicado. Los TCse cuantificaron a 492 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan Go, modelo 51119300). Una muestra blanco se preparó sometiendo el extracto original a las mismas condiciones de reacción sin el reactivo de vainillina. Por último se comparó con la curva de calibración y se realizaron los cálculos necesarios.

5.12.1.2 Fenoles

Para la determinación de fenoles se utilizó una técnica modificada por Feregrino-Pérez y col. (2011). Se tomaron 40 μ l de extracto metanólico y se pusieron en tubos, se adicionaron 460 μ l de H₂O destilada, 250 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1250 μ l de Na₂CO₃. Se cerraron los tubos y agitaron en el vortex. Se dejaron reposar 2 h en la oscuridad y posteriormente se colocaron 200 μ l en cada pozo y se leyeron en un lector de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan Go, modelo 51119300).

5.12.1.3 Capacidad antioxidante-ABTS

El método fue el descrito por Re y col. (1999). Se utilizó el 2,2'-azinobis-ácido-6-sulfónico-3-etilbenzotiazolina (ABTS) modificado para ser elaborado en microplaca de 96 pozos. Brevemente, una alícuota de 20ml del extracto metanólico se mezclaron con 230ml de una solución de ABTS⁺ previamente preparada. El control incluyó todos los reactivos excepto el extracto. La absorbancia fue leída a 730 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan Go, modelo 51119300). Los resultados para la actividad antiradical del ABTS se expresaron como μ moles equivalentes de Trolox por gramo de muestra fresca o seca (μ mol eq. Trolox/g).

5.12.1.4 Capacidad antioxidante-DPPH

La determinación de capacidad antioxidante por DPPH se obtuvo siguiendo la metodología de Braund-Williams y col. (1995). Para la curva de calibración se preparó la solución DPPH pesando 0.0015 g de DPPH y aforando a 25 ml con metanol al 80%, se sonicó hasta disolver y se cubrió con papel aluminio. Se

prepararon distintas soluciones de Trolox. Se agregaron 200 μ l de DPPH en menos de 1 minuto a cada uno de los pozos a excepción del blanco. Al blanco se le agregó H₂O. Se leyó en un lector de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan Go, modelo 51119300) a 540 nm cada 10 minutos durante 90 minutos para realizar una cinética. Los resultados para la actividad antiradical del DPPH se expresaron como μ moles equivalentes de Trolox por gramo de muestra fresca o seca (μ mol eq. Trolox/g).

5.12.2 Pruebas bromatológicas

5.12.2.1 FDN

La FDN representa la matriz insoluble de la pared celular de la planta (celulosa, hemicelulosa y lignina), son sustancias covalentemente unidas, o íntimamente asociadas mediante puentes de hidrógeno, cristalinidad u otras asociaciones intramoleculares que son resistentes a las soluciones con rango de concentración fisiológicas. Para determinar FDN, se siguió el procedimiento descrito por Van Soest y col. (1991). Se pesaron 0.5 g de la muestra, se extendió dentro de la bolsa filtrante y se pusieron las bolsitas en la canastilla del aparato de digestión ANKOM. Se agregaron 2 l de solución FDN a temperatura ambiente. Se agregaron 50 ml de α -amilasa para eliminar el almidón, se cerró y se colocó el aparato en agitación y calentamiento y se digirió 1 h, después se apagó la agitación y calentamiento, se realizó un lavado agregando 2 l de agua, después de haber abierto la valvula de equipo para que saliera la solución caliente, se encendió de nuevo el agitador y el calentador, y una vez la máquina marque 100°C, se contaron 5 minutos. Se repitió el enjuague 2 veces más (un total de tres enjuagues). Se removieron las bolsitas de la canastilla y se colocaron en un vaso de precipitado al que se agregó acetona hasta cubrir las bolsitas, se remojaron 3 minutos, se dejaron secar al aire, posteriormente en una estufa de secado a 100°C por 4 h y finalmente se metieron a un desecador y se pesaron.

5.12.2.2 FDA

La extracción de residuos de plantas con detergente ácido, tiene el propósito de aislar la fracción lignocelulósica y tiene un paso de preparación para el análisis de lignina sobre un residuo libre de la interferencia de proteínas. Para la obtención de FDA, se realizó el mismo procedimiento que en la determinación de FDN, pero en lugar de utilizar la solución FDN se utilizó FDA. (Van Soest y col., 1991).

5.12.3 Digestibilidad y producción de gas *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca MS y la producción de gas PG se realizaron por 48 horas de acuerdo a las metodologías recomendadas por Ankom Technology Corp. Macedon NY. En ambas pruebas, el inóculo ruminal se obtuvo dos horas posteriores a la alimentación de dos animales consumiendo con una mezcla de forrajes, heno de alfalfa (30%), rastrojo de maíz (20%) y heno de avena (50%) además de un concentrado a base de sorgo (69%), pasta de soya (26%) y minerales (5%).

5.13 Análisis estadístico

Los resultados de con el paquete estadístico JMP. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con posterior prueba de Tukey ($p \leq 0.1$).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Variables fenológicas

6.1.1 Altura

En el Cuadro 4 se observa que la mayor altura promedio, fue para las charolas a las que se les aplicó de manera foliar una concentración de 10 mM de H₂O₂. Estos resultados son opuestos a los encontrados por Landeta-Riverol (2011) en su trabajo sobre la aplicación de H₂O₂ en chile habanero, en el que la mayor altura fue para el testigo, a mayor concentración de de H₂O₂, menor altura. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.1$). Es posible que no se encuentren diferencias en las alturas por el corto tiempo para crecer que tiene la planta, en la técnica de forraje verde hidropónico, en la cual, la planta no alcanza su máximo desarrollo vegetativo, sino que es cosechada a tan solo 12 días después del trasplante, por lo tanto no existe la oportunidad de poder detectar alguna diferencia.

Cuadro 4. Alturas promedio correspondientes a los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Altura (cm)
T1 5 mM H ₂ O ₂ Imbibición	12.30 ^a ±1.17
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	11.64 ^a ±0.73
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	11.89 ^a ±0.62
T4 Testigo	11.90 ^a ±0.82
T5 5 mM H ₂ O ₂ Foliar	11.97 ^a ±0.52
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	12.55 ^a ±1.52
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	11.21 ^a ±0.86

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Romero y col. (2009), en su trabajo sobre la producción de FVH con semilla de cebada, utilizó un sistema de riego por goteo tipo cintilla junto con el uso de la paja molida, lo cual representó varias ventajas: mejoró la aplicación del agua de riego;

aumentó la producción de FVH de manera más eficiente, alcanzando tasas en el uso del agua del orden del 500% superiores a otras formas de producción de forraje obteniendo una altura promedio de 15 a 20 cm a los 8 días de la siembra. El riego fue de 2 minutos cada 2 horas durante todo el día (24 minutos/día) mientras que en el presente trabajo se utilizó un sistema de riego por aspersion regando 1 minuto cada hora durante las 24 horas el día (24 minutos/día), no se utilizó ningún tipo de sustrato como la paja de trigo y se realizaron las aplicaciones de H_2O_2 obteniendo alturas en el rango de 11.21 a 12.55 cm y 11.90 cm para el testigo, a los 12 días a partir de la germinación.

6.1.2 Peso de masa húmeda (MH) por charola

En el Cuadro 5 se muestran la masa húmeda promedio por charola en kg correspondiente a cada uno de los tratamientos. Se observa que el menor peso promedio fue de 1.31 kg para el tratamiento de aplicación foliar de 5 mM de H_2O_2 , mientras que el mayor fue de 1.97 kg para el tratamiento de 10 mM aplicado en la imbibición. Estos resultados son inferiores a los encontrados por Álvarez-Aguirre (2009) en su trabajo acerca de la evaluación de avena, trigo y cebada para la producción de FVH, donde obtuvo pesos promedio de 5, 4.3 y 4.8 kg por charola a los 11 de días de desarrollo a partir de la germinación. Esta diferencia puede deberse al uso de fertilización tanto química como orgánica que se utilizó en el mencionado trabajo. No se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.1$).

En la Figura 17 se observa que los tratamientos a los que se les aplicó H_2O_2 en la imbibición obtuvieron mayor masa que a los que se les aplicó de manera foliar y al testigo. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.1$). En la imbibición la mayor masa promedio se obtuvo para la concentración de 10 mM con 1.97 y la menor para la de 20 mM con 1.90, esto podría indicar que la concentración de H_2O_2 y la masa húmeda del forraje no son proporcionales. De distinta manera ocurre con los tratamientos de aplicación foliar del H_2O_2 donde el menor peso promedio fue de 1.31 kg para la concentración de 5 mM y el mayor de 1.54 kg para la concentración de 20 mM, aproximadamente 200 g de diferencia.

Cuadro 5. Peso promedio de MH por charola correspondiente a los distintos tratamientos.

Tratamientos	MH/charola(kg)
T1 5 mM H ₂ O ₂ Imbibición	1.94 ^a ±0.28
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	1.97 ^a ±0.18
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	1.90 ^a ±0.39
T4 Testigo	1.35 ^a ±0.38
T5 5 mM H ₂ O ₂ Foliar	1.31 ^a ±0.25
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	1.39 ^a ±0.33
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	1.54 ^a ±0.55

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; MH: masa húmeda.

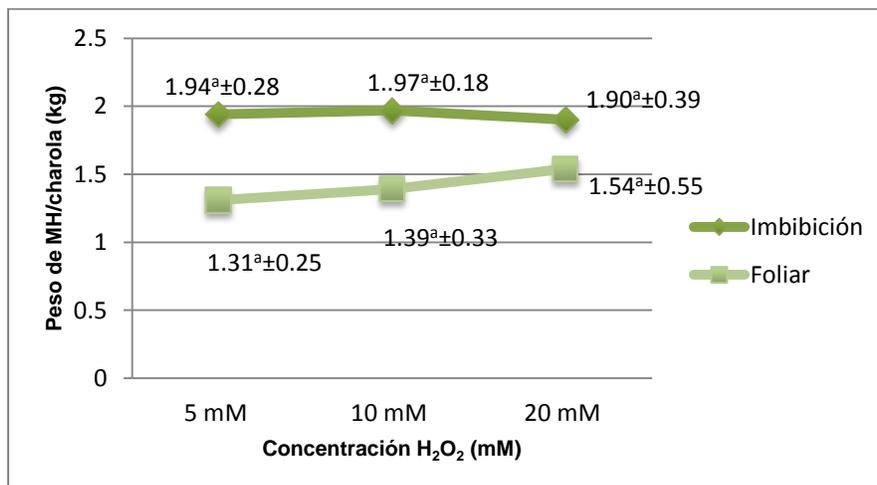


Figura 17. Efecto del tipo de aplicación del H₂O₂ en el peso de MH por charola en cada tratamiento.

6.2 Contenido de humedad

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de humedad del forraje ($p \geq 0.1$). Tierranegra-García y col. (2011), evaluaron el efecto de aplicar de

manera foliar, AS y jasmonato de metilo (JaMe), en plantas de lechuga contra el ataque de cochinillas (*Armadiillidium vulgare*), lo cual se correlacionó positivamente con los compuestos fenólicos y los flavonoides contenidos, de igual manera que en el presente trabajo, sus tratamientos no influyeron significativamente en el peso seco y fresco de las plantas, en la clorofila ni en el nitrato contenido.

En el Cuadro 6 se muestran los resultados promedio del contenido de humedad del forraje por charola. El mayor contenido de humedad fue para la aplicación del H₂O₂ en la imbibición en una concentración de 10 mM, y fue de 90.58% y el menor contenido fue para la aplicación de manera foliar con una concentración de 20 mM, se obtuvo un 89.03% de humedad. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo son más elevados que los obtenidos por Putzu-Torres (2012) los cuales van de 77% a 85%. Esto puede deberse al riego que se utilizó en cada trabajo, Putzu-Torres realizó riegos de 8:00 am a 6:00 pm cada hora durante 1 minuto (10 min/día), mientras que en el presente estudio se realizaron riegos de 7:00 am a 7:00 pm cada media hora durante 1 min (24 min/día).

Cuadro 6. Contenido de humedad promedio de los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Contenido de humedad (%)
T1 5 mM H ₂ O ₂ Imbibición	89.86 ^a ±2.09
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	90.58 ^a ±1.69
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	89.64 ^a ±2.94
T4 Testigo	88.19 ^a ±3.53
T5 5 mM H ₂ O ₂ Foliar	89.30 ^a ±2.29
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	89.03 ^a ±3.15
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	87.64 ^a ±1.96

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos

6.3 Metabolitos secundarios

6.3.1 Taninos

En el Cuadro 7 se muestran los valores obtenidos del contenido de taninos para los diferentes tratamientos. Se observa que los tratamientos a los que se les aplicó

el H₂O₂ en la imbibición obtuvieron valores más altos de taninos. Con la aplicación de 5 mM se obtuvieron 15.63 g/kg de MS, con la de 10 mM se obtuvieron 13.34 g/kg de MS y con la de 20 mM de 12.11 g/Kg de MS; mientras que los tratamientos a los que se les aplicó el H₂O₂ de manera foliar, obtuvieron concentraciones menores de taninos que el testigo.

Cuadro 7. Contenido de taninos condensados para los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Taninos g/kg de MS
T1 5 mM H ₂ O ₂ Imbibición	15.63 ^a ±2.30
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	13.34 ^a ±8.08
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	12.11 ^a ±5.20
T4 Testigo	10.97 ^a ±5.95
T5 5 mM H ₂ O ₂ Foliar	11.11 ^a ±3.89
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	10.70 ^a ±4.93
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	8.75 ^a ±1.58

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; MS: masa seca

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.1$). En la Figura 18 se observa que los tratamientos por imbibición tienen niveles de taninos más altos que los de aplicación foliar y que en ambos tipos de aplicación la tendencia es a mayor cantidad de H₂O₂, menor contenido de taninos.

El efecto de los taninos sobre la nutrición de los rumiantes puede ser perjudicial o beneficioso dependiendo de algunos factores entre los que se encuentra la concentración de estos en el alimento. Las concentraciones de taninos, tanto condensados como hidrolizables, más utilizadas y que se consideran moderadas, son <50 g/kg MS (Hervás, 2001).

Algunos niveles de taninos condensados que contienen los forrajes van de 0.405 a 0.234 g/kg de MS (Hess y col., 2006) y hasta 4.77 y 6.25 g/kg de MS (Romero-Lara, 2000)

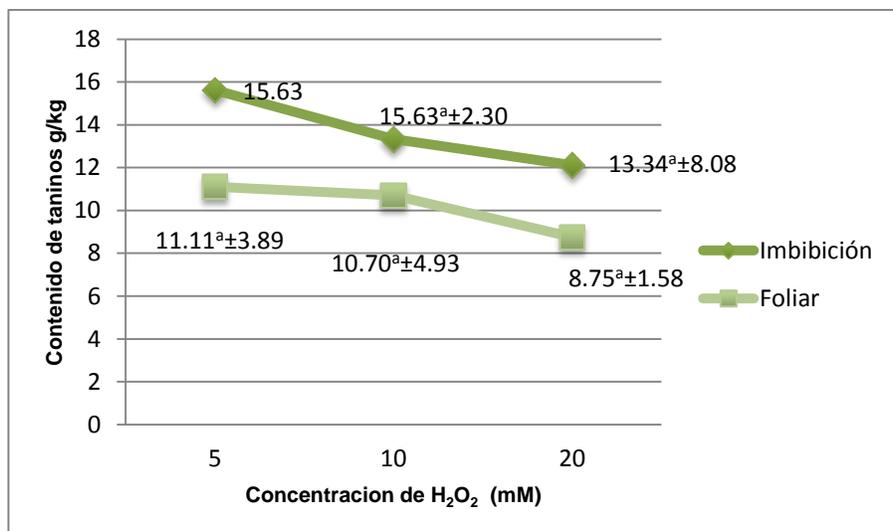


Figura 18. Efecto del tipo de aplicación de H₂O₂ en el contenido de taninos condensados en cada tratamiento.

Estas cantidades no afectan de manera negativa la alimentación del rumiante. Por otro lado, las gramíneas como la cebada y el sorgo, contiene niveles de 0.2 y hasta 57.5 g/kg de MS como los encontrados por Gómez (2012) en su trabajo acerca del nivel de taninos en el sorgo; en él expone que la composición química de los sorgos con alto y bajo nivel de taninos condensados es muy similar, difiriendo únicamente en el nivel de fibra detergente neutro (FDN).

Los niveles de taninos que se obtuvieron en el presente trabajo, se encuentran debajo del límite mencionado y no afectan de manera negativa la calidad del forraje.

6.3.2 Fenoles

No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos ($p \geq 0.1$). Cabe mencionar que el incremento de metabolitos secundarios, como lo son los compuesto fenólicos, está relacionado con las condiciones de estrés que sufre la planta, es posible que las concentraciones utilizadas y el número de aplicaciones de H₂O₂ no hayan representado este efecto. En el Cuadro 8 se observa que el tratamiento con mayor concentración de fenoles fue para el tratamiento de 5 mM aplicado en la imbibición con 206.46 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de

muestra y la menor fue para el tratamiento de 10 mM con 152.33 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de la muestra.

Cuadro 8. Concentración de fenoles en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Fenoles totales (mg equivalentes de ác. gálico/100 g MS)
T1 1 mM H₂O₂ Imbibición	206.46 ^a ±14.11
T2 10 mM H₂O₂ Imbibición	152.33 ^a ±10.54
T3 20 mM H₂O₂ Imbibición	156.58 ^a ±54.78
T4 Testigo	178.83 ^a ±11.94
T5 5 mM H₂O₂ Foliar	159.04 ^a ±27.52
T6 10 mM H₂O₂ Foliar	153.54 ^a ±36.17
T7 20 mM H₂O₂ Foliar	161.67 ^a ±23.87

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; MS: masa seca; ác: ácido.

Los valores obtenidos son muy bajos comparados con los obtenidos por Piña-González (2011) en su trabajo sobre evaluar la capacidad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de Ungi Molinae Turcz en el cual obtuvo valores para la planta de 85 200 y hasta 158 700 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra.

Las diferencias en los niveles de fenoles pueden deberse a la naturaleza de la mortilla y la del forraje de cebada, o por el extractante utilizado. Piña-González utilizó acetato de etilo como extractante mientras que en el presente estudio se utilizó metanol.

6.3.3 Capacidad antioxidante-ABTS

En el Cuadro 9, se observa la capacidad antioxidante por la técnica de ABTS de cada tratamiento. Los niveles más altos fueron para las aplicaciones de 10 mM en la imbibición con 232.79 µM equivalentes de Trolox/g de MS y 20 mM foliar con 232.35µM equivalentes de Trolox/g de MS, y el más pequeño para la aplicación foliar de 5 mM con 208.78 µM equivalentes de Trolox/g de MS. Todos los

tratamientos obtuvieron niveles menores que el testigo (244.15 μM equivalentes de Trolox/g de MS). No se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.1$).

Cuadro 9. Capacidad antioxidante ABTS de cada tratamiento.

Tratamientos	CA ABTS (μM equivalentes de Trolox/g de MS)
T1 5 mM H₂O₂ Imbibición	229.01 ^a ±16.64
T2 10 mM H₂O₂ Imbibición	232.79 ^a ±11.78
T3 20 mM H₂O₂ Imbibición	227.35 ^a ±14.54
T4 Testigo	244.15 ^a ±15.27
T5 5 mM H₂O₂ Foliar	208.78 ^a ±10.98
T6 10 mM H₂O₂ Foliar	216.21 ^a ±16.36
T7 20 mM H₂O₂ Foliar	232.35 ^a ±10.56

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; MH: masa seca; CA: capacidad antioxidante.

El valor más alto de capacidad antioxidante se presenta en los tratamientos a los que se les aplicó el H₂O₂ en la imbibición, fue para la concentración de 10 mM y el valor más alto para los tratamientos a los que se les aplicó el H₂O₂ de manera foliar fue para la concentración de 20 mM. En la Figura 19 se muestra la tendencia que siguen las dosis de aplicación en los dos métodos de aplicación. En la aplicación foliar la tendencia es directamente proporcional a la capacidad antioxidante, es decir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante.

Los valores obtenidos en el presente trabajo son menores a los obtenidos por Pérez y col. (2012), en su trabajo acerca del rendimiento, calidad nutricional, contenido fenológico y capacidad antioxidante de FVH de maíz, en el cual encontró valores de 262.5 a 300.1 μM equivalentes Trolox/g MS. Esta diferencia puede deberse a la naturaleza de la planta.

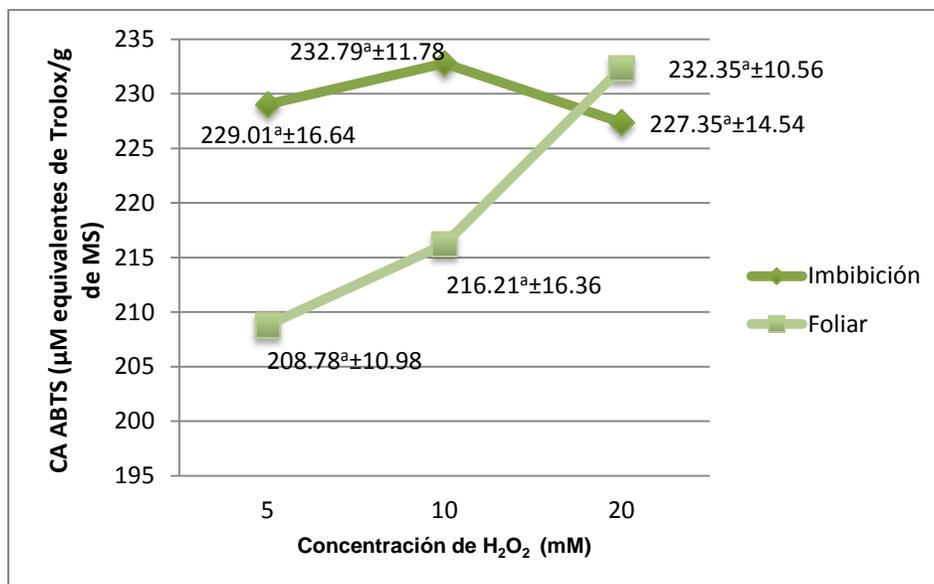


Figura 19. Efecto del tipo de aplicación de H₂O₂ en el porcentaje de la capacidad antioxidante ABTS en cada tratamiento.

Las antocianinas, que son compuestos fenólicos que se encuentran principalmente en flores frutos y hojas y son responsables de conferir los colores rojo azul y violeta en estos (Del Valle y col., 2005), están correlacionadas positivamente con la capacidad antioxidante. Generalmente existe mayor capacidad antioxidante si hay niveles altos de antocianinas, como lo muestran los resultados encontrados por Salinas-Moreno y col. (2012) en su trabajo acerca de antocianinas y actividad antioxidante en maíces, donde sus resultados indican mayor actividad antioxidante a mayor nivel de antocianinas.

Es posible que los bajos niveles de capacidad antioxidante encontrados en el presente estudio, se deban a la falta de pigmentos rojos, azules o morados en la planta, que aun aplicando diferentes dosis de H₂O₂, están ausentes.

6.3.4 Capacidad antioxidante-DPPH

En el Cuadro 10 se observan los porcentajes de inhibición de radical DPPH para cada tratamiento. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.1$). El valor más alto es para el tratamiento de 10 mM aplicación

en la imbibición con 93.61% y el menor es para el tratamiento de 5 mM aplicación foliar.

Cuadro 10. Capacidad antioxidante DPPH de cada tratamiento.

Tratamientos	CA DPPH (% de inhibición del radical DPPH)
T1 5 mM H ₂ O ₂ Imbibición	92.66 ^a ±0.68
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	93.61 ^a ±0.83
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	93.39 ^a ±0.90
T4 Testigo	92.63 ^a ±1.53
T5 5 mM H ₂ O ₂ Foliar	92.31 ^a ±1.44
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	93.00 ^a ±0.73
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	92.92 ^a ±1.69

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; CA: capacidad antioxidante.

A pesar de esto, los niveles de todos los tratamientos son muy altos comparados con los obtenidos por López-Martínez y Baeza-Jiménez (2010) en su trabajo acerca de la comparación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y antocianinas totales de diferentes variedades de maíz, donde encontraron el 68% de inhibición del radical para la variedad “Pinto”, que está entre las variedades pigmentadas y las no pigmentadas mostraron actividades de entre 30 a 55%.

Piña-González (2011) realizó un estudio acerca de la evaluación comparativa de la capacidad antioxidante y fenoles totales de diferentes ecotipos de mortilla, en el encontró porcentajes de 20 a 40% de inhibición del radical DPPH. Salinas-Moreno y col. 2012) en su trabajo acerca de antocianinas y actividad antioxidante en distintas variedades de maíces, encontró porcentajes de 8 a 55.1%.

Molina-Quijada (2009) en su trabajo acerca del contenido de compuestos fitoquímicos y su relación con la capacidad antioxidante de extractos de pimientos, encontró para las variedades Bell y Caribe alrededor del 60.41 y 83.44% de

inhibición, respectivamente y para Serrano, Anaheim y Jalapeño 44.66, 29.08 y 8.45% de inhibición.

En la Figura 20 se observa que los niveles de capacidad antioxidante DPPH que se obtuvieron en el presente estudio, para el FVH de cebada son más altos que los obtenidos por los estudios antes mencionados.

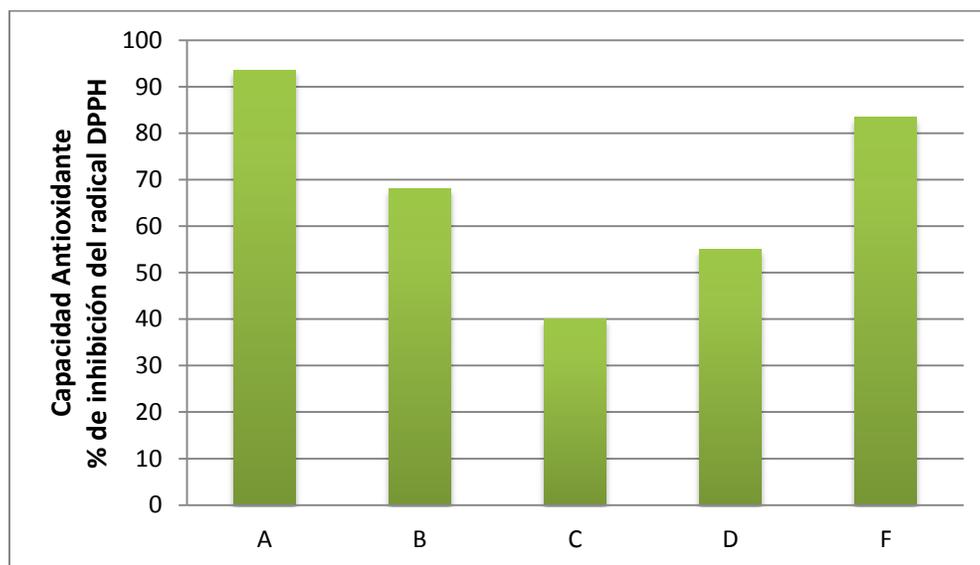


Figura 20. Comparación de la capacidad antioxidante de distintos productos alimenticios. A: FVH de cebada, B: Maíz variedad “Pinto”, C: Mortilla, D: Maíz, E: Pimiento variedad “Caribe”.

Esto es indicativo de que la capacidad antioxidante de una planta se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes, o bien, una actividad pro-oxidativa que se contrapone al potencial antioxidante. Así pues, un estudio completo de la actividad antioxidante de una planta requiere de la medición de diferentes magnitudes y por ende, del desarrollo y la normalización de métodos confiables para cada una de estas magnitudes (Gutiérrez-Avella y col., 2008).

6.4 Determinación de fibra

6.4.1 FDA

Los resultados muestran que el porcentaje más alto de FDA fue para la concentración de 5 mM en la imbibición con 28.57%, y la más baja fue para la

aplicación de 20 mM en aplicación foliar con 22.63%. No se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.1$) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de Fibra Detergente Acido (FDA) para cada tratamiento.

Tratamientos	FDA (% en MS)
T15 mM H₂O₂ Imbibición	28.57 ^a ±4.25
T2 10 mM H₂O₂ Imbibición	26.40 ^a ±3.84
T3 20 mM H₂O₂ Imbibición	27.70 ^a ±0.50
T4 Testigo	24.30 ^a ±1.60
T5 mM H₂O₂ Foliar	23.97 ^a ±2.57
T6 10 mM H₂O₂ Foliar	24.03 ^a ±2.13
T7 20 mM H₂O₂ Foliar	22.63 ^a ±1.87

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; FDA: fibra detergente ácido; MS: masa seca.

En la Figura 21 se observa que los tratamientos a los que se les aplicó el H₂O₂ en la imbibición, obtuvieron valores más altos de FDA que los que recibieron las aplicaciones de manera foliar. Los tratamiento con aplicaciones foliares disminuyeron la FDA mientras que en las aplicaciones en la imbibición aumentaron el porcentaje de FDA. Las líneas de tendencia de cada uno de los tipos de aplicación son distintas, mientras que en la imbibición la dosis de 10 mM provocó una disminución en el porcentaje, y es el más bajo de las tres concentraciones; en la aplicación foliar la dosis de 10 mM provocó un ligero aumento en el porcentaje de FDA.

Los valores obtenidos son similares a los que encontraron Bolletta y col. (2008) en su trabajo sobre el rendimiento y valor nutritivo de silajes de invierno en grano lechoso, donde sus resultados fueron de 29.21% de FDA para forraje de cebada. Mientras que Paine-Salgado (2007) encontró valores de 28.7 a 37.5% de FDA en su trabajo acerca del efecto de la época de cosecha en el rendimiento y la calidad del forraje de cebada para ensilaje

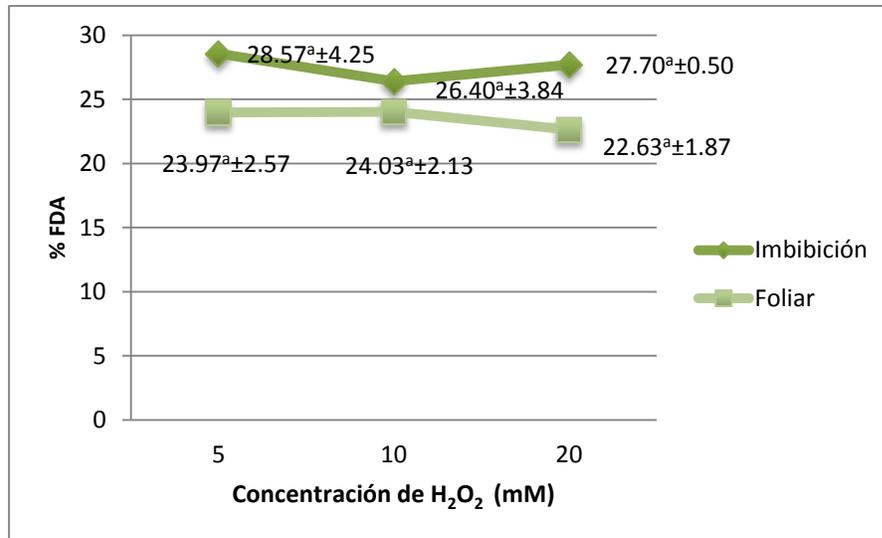


Figura 21. Comparación del tipo de aplicación de H₂O₂ en el porcentaje de FDA.

En él menciona que a partir de donde comienza el llenado del grano, la FDA y FDN se estabilizan, llegan a su máximo valor y después declinan por un efecto de dilución causado por la depositación de almodón en el grano. El FVH no llega a un llenado de grano, es posible que por esta razón los niveles de FDA sean un poco más bajos y no existan diferencias significativas.

6.4.2 FDN

En el Cuadro 12 se muestran los resultados de los porcentajes que contienen los diferentes tratamientos de FDN. El valor más alto lo obtuvo la aplicación de 20 mM en la imbibición con 58.23%, mientras que el valor más pequeño lo obtuvo el testigo, esto indica que todos los tratamientos provocaron un incremento en el contenido de FDN. Los tratamientos con aplicación en la imbibición son los que obtuvieron de manera general, valores más altos. No se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.1$).

Cuadro 12. Porcentaje de Fibra Detergente Neutro (FDN) en cada tratamiento.

Tratamientos	FDN (% en MS)
T15 mM H ₂ O ₂ Imbibición	57.87 ^a ±4.86
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	53.33 ^a ±3.52
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	58.23 ^a ±0.57
T4 Testigo	53.00 ^a ±2.52
T5 mM H ₂ O ₂ Foliar	52.13 ^a ±4.69
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	52.40 ^a ±4.81
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	53.67 ^a ±2.15

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; MS: masa seca; FDN: fibra detergente neutro.

En la Figura 22 se observa el comportamiento del porcentaje de FDN al incrementar la dosis de aplicación en los diferentes métodos utilizados para aplicar el peróxido. En ambos casos el porcentaje de FDN disminuye en la dosis de 10 mM incrementándose nuevamente en la de 20 mM.

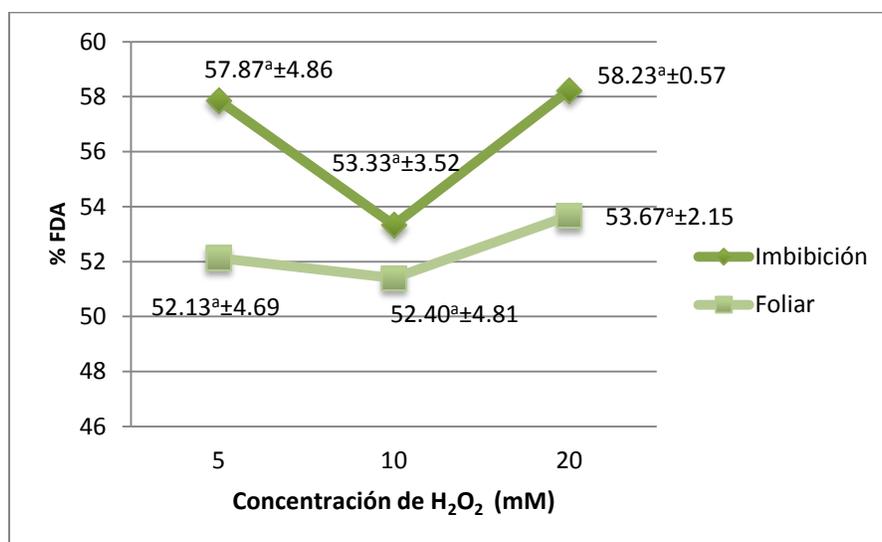


Figura 22. Comparación del tipo de aplicación del peróxido de hidrógeno en el porcentaje de FDN.

Los valores que se obtuvieron en el presente estudio concuerdan con los encontrados por Bolleta y col. (2007) en su estudio acerca de silajes de invierno,

los cuales fueron cercanos a 53.78% de FDN en cebada forrajera. Maekawa y Fantino. (2010) encontraron valores promedio de 48.41% en grano de cebada forrajera. Este valor es menor que los encontrados en el presente estudio, esto pudiera deberse a que los análisis se realizaron en el grano y en el presente estudio fueron hechos en las hojas.

Sin embargo, Sosa-Rubio y col. (2004) en su trabajo sobre el potencial forrajero de árboles y arbustos encontraron valores hasta de 72.78% de FDN, los cuales son más altos que los encontrados en el presente estudio. Los altos valores pudieran deberse a las especies que analizaron, las cuales se caracterizan por tener mayor porcentaje de fibra y taninos.

El contenido de FDN en un forraje indica la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina que contiene la planta, lo que conforma la pared celular. El FDN en hojas de leguminosa es significativamente más digestible que el FDN del tallo. Conforme el forraje madura, la relación hoja-tallo disminuye (más tallos, menos hojas) y como resultado la digestibilidad del FDN baja porque una porción más grande del total de FDN es asociada con tejido del tallo (Hoffman y col., 2007). Se considera que un forraje tiene alta calidad cuando tiene aproximadamente 70% de digestibilidad *in vitro* de la materia seca, menos de 50% de FDN y más de 15% de proteína bruta (PB). Por lo contrario, en uno de baja calidad la DIVMS disminuye a menos del 50%, la FDN sube a más del 65% y la PB baja a menos del 8% (Di-Marco, 2011). Los resultados obtenidos en el presente estudio no son mayores a 65% por lo tanto no puede considerarse de mala calidad.

6.5 Producción de gas y digestibilidad *in vitro*

6.5.1 Producción de gas *in vitro*

En el Cuadro 13 se observan los resultados de producción de gas *in vitro* para cada uno de los tratamientos. La menor producción de gas la obtuvo el tratamiento de 20 mM aplicación en la imbibición con 120.02 ml de gas/g MS, mientras que la mayor producción la obtuvo el tratamiento de 10 mM aplicación foliar con 144.29 ml gas/g MS; se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos

($p \leq 0.1$). Todos tratamientos aplicados de manera foliar rebasaron la producción de gas del testigo, la cual es de 138.58 ml gas/g MS.

Cuadro 13. Producción de gas *in vitro* en ml gas/g MS para cada tratamiento.

Tratamientos	PG (ml gas/g MS 48 h)
T1 5 mM H ₂ O ₂ Imbibición	127.62 ^{ab} ±12.57
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	141.64 ^{ab} ±5.00
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	120.02 ^b ±6.83
T4 Testigo	138.58 ^{ab} ±10.15
T5 5 mM H ₂ O ₂ Foliar	138.95 ^{ab} ±10.27
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	144.29 ^a ±9.69
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	138.69 ^{ab} ±2.73

Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos; MS: masa seca; PG: producción de gas.

Las curvas de producción de gas durante 48 horas de incubación de los tratamientos se muestran en la Figura 23. Todos los tratamientos, tanto los de aplicación en la imbibición como en la foliar, incrementaron la producción de gas a medida que pasó el tiempo de manera similar.

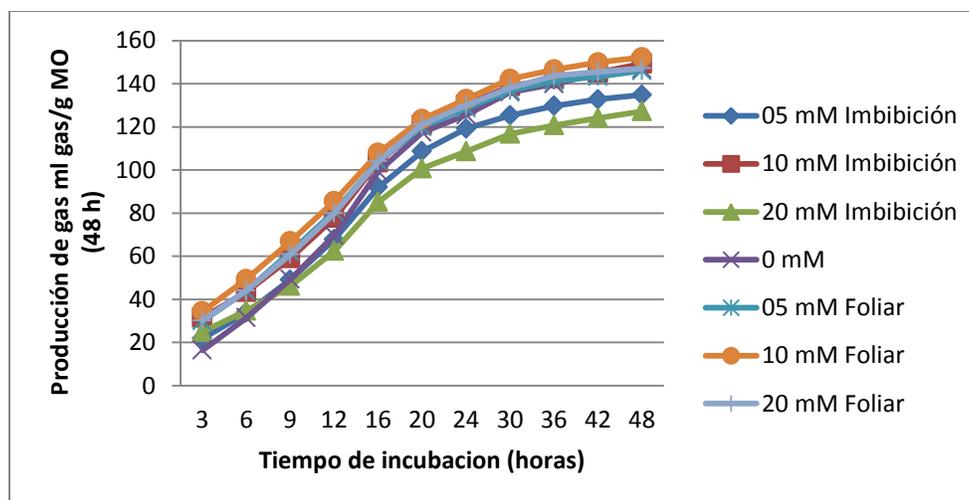


Figura 23. Producción de gas *in vitro* durante el tiempo de incubación.

En la Figura 24 se observa una relación entre el contenido de taninos y la producción de gas *in vitro* según el tipo de aplicación del elicitor. Los tratamientos con aplicación en imbibición obtuvieron menores valores promedio de producción de gas y mayor contenido de taninos, por el contrario los tratamientos con aplicación foliar obtuvieron mayores valores promedio de producción de gas y menor contenido de taninos. Esto concuerda con Longo y col. (2006) en su trabajo sobre la emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global, donde encontraron que las plantas con mayores contenidos de taninos fueron capaces de reducir la producción de gas *in vitro*. De igual manera Andrade-Rivero y col. (2012) en su estudio acerca de la producción de gas metano utilizando plantas taníferas, encontraron que la inclusión de estas especies en la dieta de rumiantes redujo la producción de gas *in vitro*. El uso de forrajes ricos en taninos es una estrategia que se ha utilizado para reducir las emisiones de gas metano, ya que los taninos forman complejos con las proteínas y provocan una reducción de la digestibilidad y de la producción de gas en el rumen.

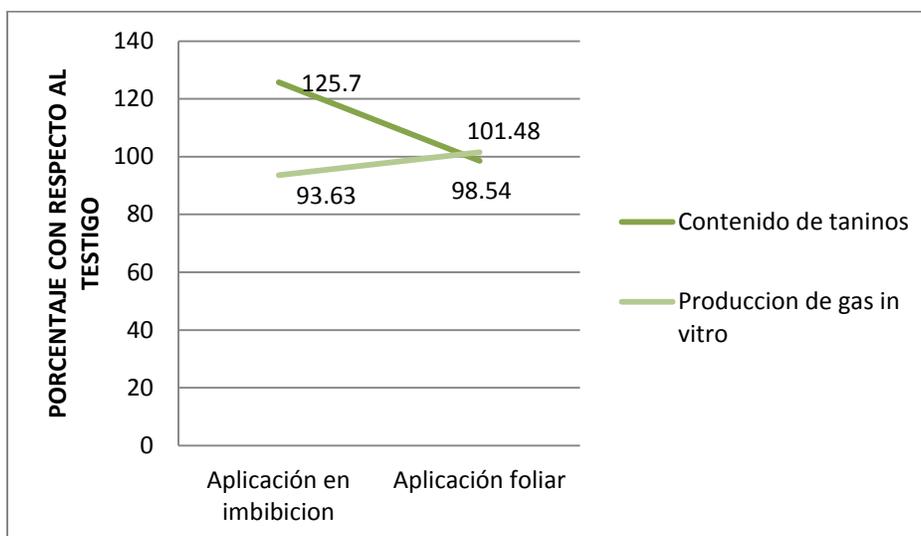


Figura 24. Relación entre el contenido de taninos y la producción de gas *in vitro* por método de aplicación del peróxido de hidrógeno.

En la Figura 25 se observa la tendencia que siguen los tratamientos al incrementar la dosis; en ambos tipos de aplicación, tanto foliar como en imbibición, la producción de gas incrementó en la dosis de 10 mM reduciéndose en los tratamientos de 20 mM, esto más notorio en la aplicación por imbibición. Esto indica que la aplicación del elicitor peróxido de hidrógeno a la concentración de 20 mM reduce la producción de gas *in vitro* y existen mejores resultados aplicándolo en la imbibición.

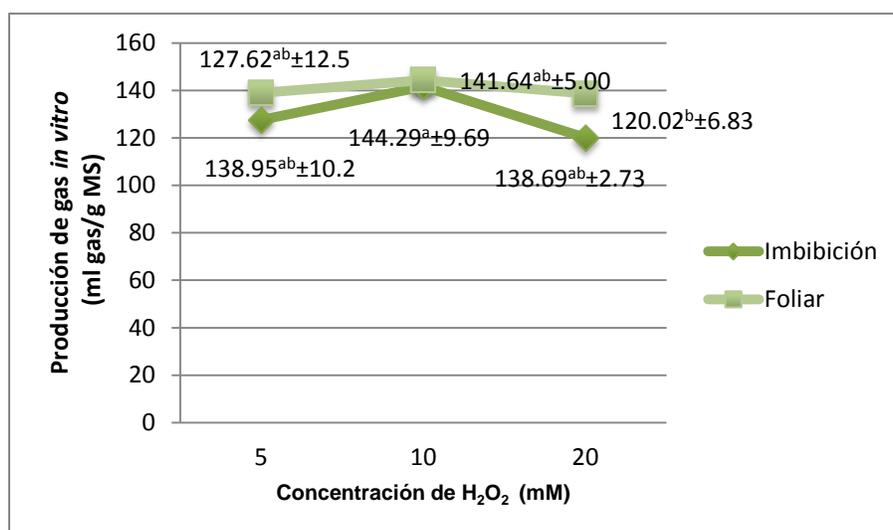


Figura 25. Comparación del tipo de aplicación en la producción de gas *in vitro*.

Los resultados encontrados en el presente estudio son mayores a los encontrados por Lara y col. (2009), en su estudio sobre la producción de gas *in vitro* y la cinética de degradación de harina de forraje donde encontró valores de 30.5 y hasta 69.8 ml gas en diferentes partes de plantas de maíz. Por el contrario son menores a los encontrados por Villegas-Castañeda y col. (2010) en su trabajo acerca de la reducción de gas *in vitro* y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligniolíticos donde encontró valores de 168.61 y hasta 382.10 ml de gas.

El ANOVA muestra que la aplicación del elicitor peróxido de hidrógeno en dosis de 20 mM en la imbibición, disminuye la producción de gas *in vitro* y la aplicación foliar de 10 mM, la aumenta significativamente.

6.5.2 Digestibilidad *in vitro* de MO y MS

En el Cuadro 14 se muestran los resultados de la digestibilidad *in vitro* de MS (DIVMS). El tratamiento de 10 mM aplicado en la imbibición fue el que obtuvo el mayor porcentaje de digestibilidad en MS con un 76.19%, mientras que el menor lo obtuvo el tratamiento de 20 mM aplicación foliar con un 69.55%. No existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.1$).

Cuadro 14. Porcentaje de digestibilidad *in vitro* por MS para cada tratamiento.

Tratamientos	DIVMS (%)
T15 mM H ₂ O ₂ Imbibición	72.16 ^a ±2.91
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	76.19 ^a ±3.11
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	69.76 ^a ±2.66
T4 Testigo	70.72 ^a ±6.74
T5 mM H ₂ O ₂ Foliar	70.98 ^a ±0.52
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	70.46 ^a ±5.64
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	69.55 ^a ±4.05

Las leguminosas son más digeribles que las gramíneas, ya que tienen menor contenido de fibra. Las hojas de las gramíneas desarrollan una vena central que les da soporte y rigidez estructural y que hace que sus hojas tengan el doble de fibra que las de las leguminosas, lo que las hace menos digeribles (Barahona y Sánchez-Pinzón, 2005).

La cebada es una gramínea al igual que el maíz, sin embargo los resultados obtenidos en el presente trabajo son más altos a los obtenidos por Herrera-Angulo y col. (2007) en su estudio sobre digestibilidad en FVH de maíz, en el que obtuvo valores promedio de 55.9%; y a los de López-Aguilar y col. (2009) en su estudio acerca del FVH de maíz como alternativa de producción de alimento para el ganado en zonas áridas en el que obtuvo valores promedio de 64.3% de digestibilidad en el forraje. Sin embargo Fuentes-Rodríguez y col. (2007) en su estudio sobre la digestibilidad *in vitro* de alfalfa hidropónica, que es una leguminosa, obtuvo 79.09% de digestibilidad Figura 26.

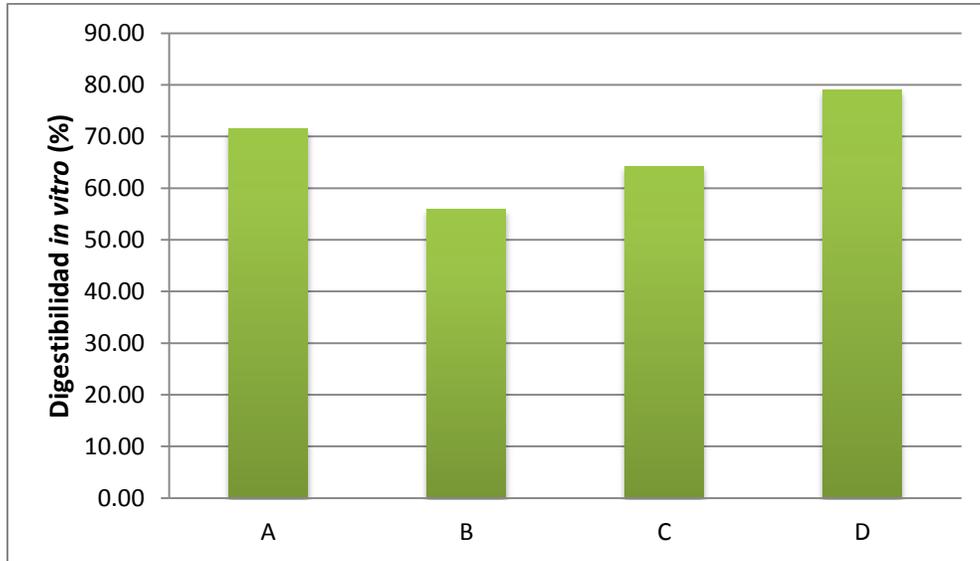


Figura 26. Comparación de digestibilidad *in vitro* de distintas especies. A: FVH de cebada, B: FVH de maíz 1, C: FVH de maíz 2, D: FVH de alfalfa.

En la Figura 27 se observa la tendencia que sigue el aumento de las dosis en cada tratamiento. Mientras que en la aplicación foliar el aumento en la dosis causa una disminución del porcentaje de digestibilidad, en la aplicación en imbibición incrementa el porcentaje de digestibilidad al incrementar la dosis de 5 a 10 mM y después disminuye nuevamente.

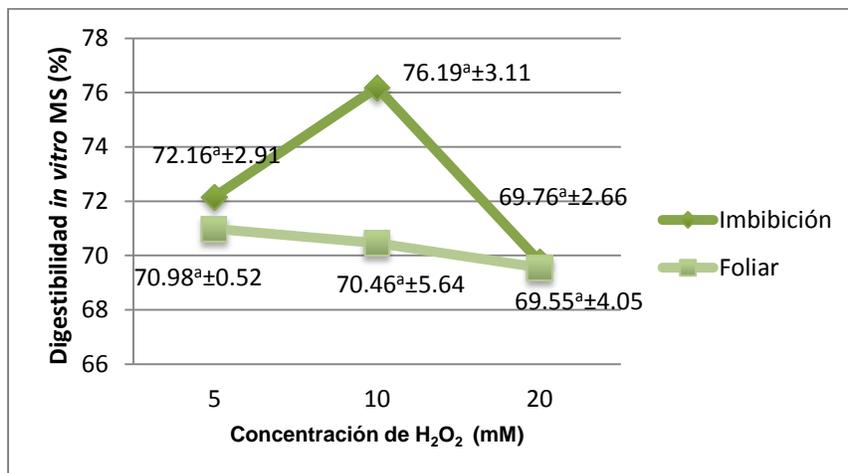


Figura 27. Comparación del tipo de aplicación en el porcentaje de digestibilidad.

Se conoce que la presencia de metabolitos secundarios con propiedades antinutritivas, como los son los taninos en excesivas cantidades, disminuyen la

digestibilidad del forraje. Esto sugiere que a mayor cantidad de taninos menor digestibilidad habrá en el forraje, sin embargo en el presente estudio el contenido de taninos y el porcentaje de digestibilidad muestran el mismo comportamiento al incrementar la dosis de aplicación. El mayor contenido de taninos lo obtuvo el tratamiento 10 mM aplicación en imbibición, al igual que el mayor porcentaje de digestibilidad; y en la aplicación foliar, el incremento en la dosis de aplicación disminuye el contenido de taninos al igual que el porcentaje de digestibilidad Figura 28.

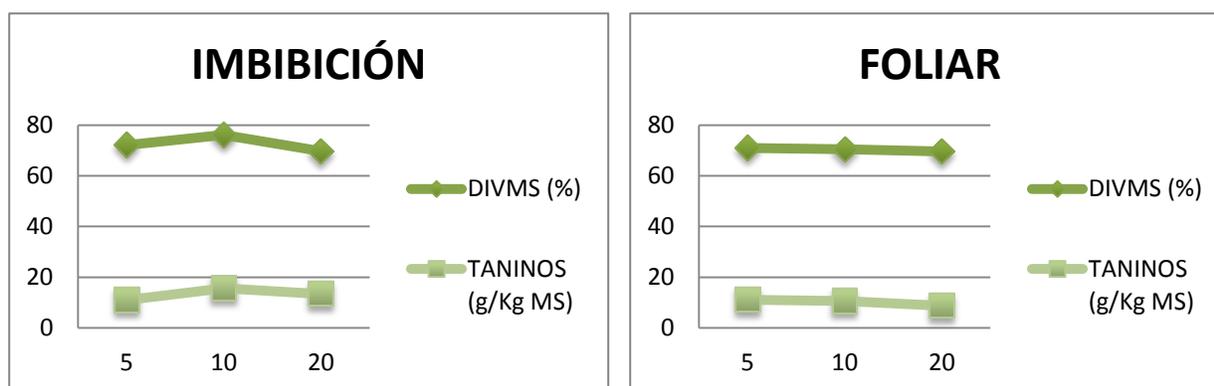


Figura 28. Comparación del contenido de taninos y el porcentaje de digestibilidad *in vitro* del FVH de cebada.

La materia seca en un alimento se puede dividir en materia orgánica (MO) e inorgánica. Los compuestos que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno se clasifican como orgánicos. Los compuestos inorgánicos o minerales son el calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, cloro y azufre entre algunos otros.

En el Los valores son ligeramente menores que los obtenidos en la DIVMS ya que la MO forma parte de la MS.

Cuadro 15 se muestran los resultados de la digestibilidad *in vitro* de MO (DIVMO). Al igual que en la DIVMS, el tratamiento de 10 mM aplicación en la imbibición fue el que obtuvo el mayor porcentaje de digestibilidad con un 75.84%, mientras que el menor lo obtuvo el tratamiento de 20 mM aplicación foliar con un 68.60%. No existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.1$).

Los valores son ligeramente menores que los obtenidos en la DIVMS ya que la MO forma parte de la MS.

Cuadro 15. Porcentaje de digestibilidad *in vitro* en MO por tratamiento.

Tratamientos	DIVMO (%)
T15 mM H ₂ O ₂ Imbibición	71.30 ^a ±1.54
T2 10 mM H ₂ O ₂ Imbibición	75.84 ^a ±2.33
T3 20 mM H ₂ O ₂ Imbibición	68.91 ^a ±0.75
T4 Testigo	69.94 ^a ±5.34
T55 mM H ₂ O ₂ Foliar	70.16 ^a ±2.67
T6 10 mM H ₂ O ₂ Foliar	69.54 ^a ±3.12
T7 20 mM H ₂ O ₂ Foliar	68.60 ^a ±4.19

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; DIVMO: digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica.

Los valores obtenidos en el presente estudio son menores a los mostrados por Riffel y col. (2000) en su trabajo acerca de suplementación con granos de maíz y cebada a bovinos de pastores, en el que obtuvieron valores promedio de 83.6% de digestibilidad *in vitro* MO. Esto pudiera deberse a que Riffel y col. utilizaron el grano de cebada en sus análisis y no las hojas. El grano es más digerible por contener menor cantidad de fibra que las hojas.

6.6 Resumen de resultados

En el Cuadro 16 se muestran los resultados obtenidos en el presente estudio para las variables analizadas de cada uno de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna de las pruebas ($p \geq 0.1$). Es posible que en algunos casos, no se encontraran diferencias por el corto desarrollo de la planta, la cual se cosechó en la etapa vegetativa, apenas a los 8 días después de la germinación

Cuadro 16. Resultados a los tratamientos en cada variable analizada

VARIABLE/TT	Imbibición 5 mM	Imbibición 10 mM	Imbibición 20 mM	Testigo 0 mM	Foliar 5 mM	Foliar 10 mM	Foliar 20 mM
AL (cm)	12.30±1.17	11.64±0.73	11.89±0.62	11.90±0.82	11.97±0.52	12.55±1.52	11.21±0.86
MH (kg)	1.94±0.28	1.97±0.18	1.90±0.39	1.35±0.38	1.31±0.25	1.39±0.33	1.54±0.55
CH (%)	89.86±2.09	90.58±1.69	89.64±2.94	88.19±3.53	89.30±2.29	89.03±3.15	87.64±1.96
TN (g/kg MS)	15.63±2.30	13.34±8.08	12.11±5.20	10.97±5.95	11.11±3.89	10.70±4.93	8.75±1.58
FE (mg ac. gálico/100 g)	204.46±14.11	152.33±10.54	156.58±54.78	178.83±11.94	159.04±27.5	153.54±36.17	161.67±23.87
ABTS (µM eq de Trolox/g de MS)	229.01±16.64	232.79±11.78	227.35±14.54	244.15±15.27	208.78±10.9	216.21±16.36	232.35±10.56
DPPH (% de inhibición del radical)	92.66±0.68	93.61±0.83	93.39±0.90	92.63±1.53	92.31±1.44	93.00±0.73	92.92±1.69
FDA (%)	28.57±4.25	26.40±3.84	27.70±0.50	24.30±1.60	23.97±2.57	24.03±2.13	22.63±1.87
FDN (%)	57.87±4.86	53.33±3.52	58.23±0.57	53.00±2.52	52.13±4.69	52.40±4.81	53.67±2.15
PG (ml gas/g MS)	127.62±12.57 ^{ab}	141.64±5.00 ^{ab}	120.02±6.83 ^b	138.58±10.15 ^{ab}	138.95 ^{±ab}	144.29±9.69 ^a	138.69±2.73 ^{ab}
DG (% MS)	72.16±2.91	76.19±3.11	69.76±2.66	70.72±6.74	70.98±0.52	70.46±5.64	69.55±4.05

TT; TRATAMIENTO, AL; ALTURA, MH; PESO DE MASA HUMEDA, CH; CONTENIDO DE HUMEDAD, TN; CONTENIDO DE TANINOS, FE; FENOLES, ABTS; CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS, DPPH; CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DPPH, FDA; FIBRA DETERGENTE ACIDO, FDN; FIBRA DETERGENTE NEUTRO, PG; PRODUCCION DE GAS IN VITRO MS, DG; DIGESTIBILIDAD MS.

También pudiera deberse a la escasa cantidad de aplicaciones de manera foliar que recibieron los tratamientos, solamente fueron dos aplicaciones y los resultados más notorios fueron para los tratamientos a los que se les aplicó el peróxido de hidrógeno en la imbibición. En las variables Peso de masa húmeda, Contenido de Taninos, Fenoles, FDA, FDN y Digestibilidad de MS los valores obtenidos resultaron más altos en las aplicaciones en imbibición; sin embargo, en el caso de FDA y FDN se prefiere que los valores sean bajos a pesar de que los valores obtenidos no son perjudiciales. Además a pesar de haber incrementado de manera moderada FDA y FDN la digestibilidad también aumentó de manera general en la aplicación por imbibición, lo que hace que el forraje sea de mejor calidad.

Con el incremento en el contenido de taninos en los tratamientos con aplicación en la imbibición, disminuyó la producción de gas en estos tratamientos, lo que trae consigo una mejor calidad en el forraje.

En cuanto a la CA DPPH se encontró que los valores son más altos que otros forrajes como el maíz e incluso productos para alimentación humana como el chile. No obstante los resultados no muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

En el Cuadro 17 se muestra el porcentaje de incremento o decremento que tuvieron las variables evaluadas respecto al testigo en cada tratamiento.

Cuadro 17. Porcentaje de incremento o decremento de las variables en cada tratamiento respecto al testigo

VARIABLE/TT	Imbibición 5 mM	Imbibición 10 mM	Imbibición 20 mM	Foliar 5 mM	Foliar 10 mM	Foliar 20 mM
AL	3.36	-2.18	-0.08	0.59	5.18	-6.16
MH	43.70	45.93	40.74	-2.96	2.88	12.34
CH	1.89	2.71	1.64	1.26	0.94	-0.63
TN	42.48	21.60	10.39	1.28	-2.52	-25.37
FE	14.33	-14.82	-12.44	-11.07	-16.47	-10.61
ABTS	-6.20	-4.65	-6.88	-14.49	-12.92	-5.08
DPPH	0.03	1.06	0.82	-0.35	0.40	0.31
FDA	17.57	8.64	13.99	-1.36	-1.12	-7.38
FDN	9.19	0.62	9.87	-1.64	-1.15	1.25
PG	-7.91	2.21	-13.39	0.27	3.96	0.08
DG	2.04	7.73	-1.36	0.37	-0.37	-1.68

Dentro de los tratamientos en las aplicaciones en la imbibición los que podrían ser seleccionados por los obtener mejores resultados son la dosis de 5 mM y la de 20 mM.

En el tratamiento de 5 mM incrementó el peso de masa húmeda por charola en un 43.70%, el contenido de fenoles en un 14.33%, el porcentaje de FDA en un

17.57%, el de FDN en un 9.19% y el contenido de taninos en un 42%. A pesar del incremento de taninos y de FDN y FDA, la digestibilidad también aumentó 2.04% y la producción de gas disminuyó 7.91%. En el tratamiento de 20 mM se incrementó el peso de masa húmeda por charola 40.74%, el porcentaje de FDA 13.99%, el de FDN en un 9.87% y el contenido de taninos en 10.39%, el contenido de fenoles disminuyó 12.44% y la digestibilidad disminuyó 1.36% pero la producción de gas también disminuyó 13.69%.

Ningún tratamiento rebasó los límites recomendados en el contenido de taninos, FDA y FDN, que se consideran para que el forraje sea de buena calidad, en algunos tratamientos se logró el aumento de variables como la digestibilidad, capacidad antioxidante y peso de masa húmeda por charola. Además en el tratamiento 20 mM aplicación en la imbibición se logró disminuir la producción de gas significativamente.

VII. CONCLUSIONES

Los mejores resultados los obtuvieron los tratamientos a los que se les aplicó el peróxido de hidrógeno en la imbibición. Es posible que si se utilizan dosis más altas de peróxido sean más notorios los resultados y se encuentren diferencias significativas. Es una opción incrementar las dosis ya que en la aplicación de 20 mM disminuyó la digestibilidad en menor porcentaje que la producción de gas, tal vez vale la pena disminuir la digestibilidad sin sobrepasar los límites recomendados, para reducir también la producción de gas, además no se puede asegurar que el incremento en las dosis provoque la misma relación de valores que en la dosis de 20 mM.

En los tratamientos de aplicación foliar se obtuvieron resultados negativos, en las tres dosis la producción de gas incremento ligeramente y disminuyeron las variables capacidad antioxidante, fenoles, FDA y en el caso de la dosis 20 mM, disminuyó la digestibilidad. Es posible que esto se deba al número de aplicaciones que se realizó durante el desarrollo del forraje, solo fueron dos, en un futuro estudio podrían aplicarse más número de veces.

Algunas variables de las que fueron evaluadas, como FDN y FDA se estabilizan en la edad adulta de la planta. Se cosechó a las 8 días después de la germinación, probablemente la planta era demasiado joven para poder detectar algunos compuestos en ellas y por eso no se obtuvieron diferencias significativas; quizá debiera dejarse crecer más el forraje, de entre 12 y 15 días después de la germinación en futuros estudios.

A pesar de lo anterior, el uso del elicitador peróxido de hidrógeno incrementa la calidad del forraje verde hidropónico al disminuir la producción de gas significativamente sin sobrepasar los límites recomendados en el contenido de taninos. Además en el tratamiento de 5 mM en la imbibición incrementaron la capacidad antioxidante y el peso de masa húmeda por charola. Por lo tanto se cumple la hipótesis del presente estudio, la aplicación del peróxido de hidrógeno aumenta la calidad del forraje hidropónico.

El peróxido de hidrógeno es un elicitor que incrementa la calidad del forraje verde hidropónico, cuando es utilizado de manera controlada en bajas concentraciones mediante la técnica de imbibición, aumenta la digestibilidad y disminuye la producción de gas *in vitro* sin sobrepasar los límites establecidos del contenido de taninos en el forraje verde hidropónico.

VII. LITERATURA CITADA

Álvarez Aguirre L. A. 2009. Evaluación de avena, trigo y cebada para producción de forraje verde hidropónico, Tesis de Especialidad en Ingeniería de Invernaderos, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Andrade-Rivero E., Martínez-Campos A. R., Castelan-Ortega O. A., Ríos-Quezada J., Pacheco-Ortega Y. y Estrada-Flores J. G. 2012. Producción de metano utilizando plantas taníferas como substrato en fermentación ruminal in vitro y efecto de extractos fenólicos en la microflora ruminal, en su estudio acerca de la producción de gas metano utilizando plantas taníferas, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 15, págs. 301 – 312

Barahona R. y Sánchez-Pinzón S. 2005. Limitaciones Físicas Y Químicas De La Digestibilidad De Pastos Tropicales Y Estrategias Para Aumentarla. *Rev. Corp*, vol. 6 no. 1.

Benzer-Benzer M., Castro-Mercado E. y García-Pineda E. 2008. La producción de Especies Reactivas de Oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas, *Rev. Mex. de Fit.*, vol.26 no.1 Ciudad Obregón

Bernal Bechara L. 2007. Efecto de las leguminosas ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal in vitro y producción de leche en bovinos, Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia.

Bolletta A., Lagrange S., Zilio J., Giménez F. y Tomaso J. C. 2007. Silajes de verdeos de invierno, INTA - Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS), Estación Experimental Agropecuaria Bordenave - Unidad de Comunicaciones Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

Bonilla Cárdenas, J. A., y Lemus Flores, C. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático: Revisión. *Rev. Mex. de ciencias pecuarias*, vol. 3 no. 2, págs. 215-246.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E. y Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, vol. 22, págs. 25-30, 1995

Carmona J. C., Bolívar D. M. y Giraldo L. A. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo, Rev. Col. de Ciencias Pecuarias vol. 18 no. 1.

Cardador-Martínez A., Castaño-Tostado E. y Loarca-Piña G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. Food Addit. Contam., vol. 19 no. 1, págs. 62–69.

Cheng K. J. y Costerton J. W. 1980. Adherent rumen bacteris: their role in the digestion of plant material, urea and epitelital cell. en: Digestive psicology metabolism in rumiants. Y. Ruckebush, y P. Thivend, Eds. MTP Press, Lycaster, págs. 227-250.

De Blas, C., Rebollar-García P., Cambra-López M. y Torres A. G. 2008. Contribución de los rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero, XXIV curso de especialización FEDNA, págs. 121-150.

Del Valle Leguizamón G., González León A y Baéz Sañudo R. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color, Rev. Mex. Oct-Dic., vol. 28, no. 4, Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Chapingo, México, págs. 359-368.

Deshpande S. S. y Cheryan M. (1987). Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays, Journal of Food Science, vol. 52 no. 2, págs. 332-334.

Di Marco O. 2011. Estimación de la calidad de los forrajes, Producir XXI, Bs. As., Facultad de Ciencias Agrarias. Unidad Integrada Balcarce INTA Balcarce, vol. 20 págs. 24-30.

Elizondo, J. 2005. Forraje verde hidropónico: una alternativa para la alimentación animal. Rev. ECAG, vol. 32, págs. 36-39.

FAO. 2001. Manual técnico FORRAJE VERDE HIDROPONICO, Mejoramiento de la disponibilidad de alimentos en los Centros de Desarrollo Infantil del INNFA, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago, Chile.

Feregrino-Pérez A. A., Torres-Pacheco I., Vargas-Hernández M., Mungia-Fragozo P. V., Loarca-Piña G. F., Mendoza-Días S. O., Ocampo-Velázquez R. V., Rico-García E. y Guevara-González R. G. 2011. Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia pennatula* pods, *J of Sci. & Ind. Res.*, vol. 70, págs.859-864.

Fuentes-Rodríguez J. M., Torres-Hernández M., Suarez-García L., Ruíz Zarate F., Murillo-Soto M. E., Ortizde La Rosa B., Peña-Oranday R. yGarcía-Castillo R. 2007. Digestibilidad in vitro de Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Hidropónica, en *Avances y Resultados de Proyectos de Investigación, Segunda Edición 2008*, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, págs. 3-10.

Gomez, J. 2012. Efecto del nivel de taninos del sorgo (*Sorghum bicolor* L Moench) sobre la dinámica de la digestión de las káfirinas y la función digestiva en lechones recién destetados, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Gurbuz, Y. 2009. Efectos del contenido de taninos condensados de algunas especies de leguminosas en la emisión de gas metano. *Rev. Cub. Cienc. Agríc.*, vol. 43 no. 3, págs. 265.

Gutierrez-Avella, D. M., Ortiz-García, C. A. y Mendoza-Cisneros, A. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Universidad Autónoma de Queretaro. México

Halliwell, B., Zhao, K. y Whiteman, M. 1999. Nitric oxide and peroxynitrite: the ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radical Research* vol. 31, págs. 651–669.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford University Press. New York, USA, pág.888.

Herrera-Angulo A., Depablos L. A., López R., Benezra M. A. y Ríos L. 2007, Degradabilidad y digestibilidad de la materia seca del forraje hidropónico de maía (*Zea mays*), *Rev. Cient. FCV-LUZ*, vol. 17 no. 4, págs.. 327-379.

Hervás, G., 2001. Los taninos condensados de quebracho en la nutrición de ovejas, Universidad de León, España.

Hess, F. N. T., T. Tiemann. 2006. Efecto del sitio de producción en la composición química y las características de fermentación ruminal de *Callandria calothyrsus* var Pututul. Taller taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia vol. 62

Hoffman P. C., Lundberg K. M., Bauman L. M., Shaver R. D. y Contreras-Govea F. E. 2007. El Efecto de la Madurez en la Digestibilidad del FDN (Fibra Detergente Neutro), Focus on Forage, vol. 5 no. 15, págs. 1-2.

Jouany, J. P., y Morgavi, D. P. 2007. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. Sanint-Genes-Champanelle, France.

Lara P. E., Canché M. C., Magaña H., Aguilar E. y Sanginés J. R. 2009. Producción de gas in vitro y cinética de degradación de harina de forraje de morera (*Morus alba*) mezclada con maíz, Rev. Cub. de Cienc. Agríc., vol. 43, no. 3, págs. 273-279.

Landeta-Riverol R. R. 2011. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la pungencia del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), bajo condiciones de invernadero, Tesis de Especialidad en Ingeniería de Invernaderos, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro México.

Longo A. C., Hummel B. J., Kehraus B. S., Liebich C. J., Burauel C. P., Abdalla A. A. L. y Südekum B. K. H. 2006 Effects of tanniferous plants on in vitro enteric methane and other rumen fermentation products. GGAAC. New Zeland.

López-Aguilar, R., Murillo-Amador, B., y Rodríguez-Quezada, G. 2009. El forraje verde hidropónico (FVH): Una alternativa de producción de alimento para el ganado en zonas áridas. Interciencia, vol 34 no. 2, págs. 121-126.

López-Martínez X. L. y Baeza-Jiménez R. 2010. Comparación de la Capacidad Antioxidante, Compuestos Fenólicos y Antocianinas Totales de Diferentes Variedades de Maíz (*Zea mays* L). *Invest.*, vol. 5 no. 2, págs. 19-22.

Maekawa M., y Fantino F. 2010. Silaje de cereales de invierno: acumulación de biomasa y composición química, *Eea. Inta Gral. Villegas*, págs 91-94.

Marcano D. y Hasegawa M. 2002. *Fotoquímica Orgánica*, Editorial Torino, Venezuela, págs. 123, 124, 125, 177, 178, 184.

Mejía-Teniente, L., Durán-Flores, F. D. D., Chapa-Oliver, A. M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M. M., y Guevara-González, R. G. 2013. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14 no. 5, págs. 10178-10196.

Mora Herrera M. E., López Delgado H., Castillo Moraales A., Foyer C. H. 2005. Salicylic acid and H_2O_2 function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato, *Physiol Plant*, vol. 125, págs. 430-440.

Molina-Quijada D. M. 2009. Contenido de compuestos fitoquímicos y su relación con la capacidad antioxidante de extractos de pimientos (*Capsicum annuum* L.) cultivados en el noroeste de México, Tesis de Maestría, división de ciencias biológicas de la salud departamento de investigaciones científicas y tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

Navarrete Flores R. O. 2008. Estudio de la productividad de dos gramíneas (*Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum*) y una leguminosa (*Vicia* sp.) para forraje verde hidropónico (FVH) con tres cortes sucesivos en la granja ECAA, Tesis de licenciatura en Ingeniería Agropecuaria, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ibarra, Ecuador.

Orskov, E. R. 1992. *Protein nutrition in ruminants*. Academic Press Limited, Oval Road, London NW1 7DX, UK, págs. 24-28.

Patra AK., Kamra DN, y Agarwal N. 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed rumen liquor of buffalo. *Anim Feed Sci Technol*, vol. 128, págs. 276-291.

Pérez, L. S., Rivera, J. R. E., Rangel, P. P., Reyna, V. D. P. Á., Velázquez, J. A. M., Martínez, J. R. V. y Ortiz, M. M. 2012. Rendimiento, calidad nutricional, contenido fenólico y capacidad antioxidante de forraje verde hidropónico de maíz (*Zea mays*) producido en invernadero bajo fertilización orgánica. *Interciencia*, vol. 37 no. 3, págs. 215-220.

Piña-González, Y. 2011. Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de *Ungi molinae* Turcz, Universidad de Chile, Chile.

Paine-Salgado J. M. 2007. Efecto de la época de cosecha en el rendimiento y calidad de cinco cultivares cebada (*Hordeum Vulgare* L.) para ensilaje, Tesis de Licenciatura, Universidad de la frontera, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Temuco, Chile.

Putzu-Torres A. P. 2012. Comparación del rendimiento en la producción de forraje verde en diferentes sistemas de cultivo, Tesis de especialidad en invernaderos, Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de ingeniería, Querétaro, Querétaro, México.

Ramírez–Restrepo C. A., Barry T. N., Mc William E. L., López–Villalobos N. y Clark H. 2007. Methane production from sheep grazing either willow fodder blocks or dryland pastur, *Animal Feed Science and Technology*, vol. 155 no. 1, págs. 33-43.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, págs. 1231–1237.

Riffel S. L., Garciniega A. D., J. P. y Vicentin J. 2000, Suplementación con granos de maíz a bovinos en pastoreo de otoño, en XVI Reunión Latinoamericana de Producción Animal, Montevideo, Uruguay.

Riveros Angarita, A. S. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible, no. 61, págs. 6-7.

Riveros Angarita, A. S. 2010. Inducción de resistencia en plantas, Interacción: planta-patógeno, San José, Costa Rica, pág. 120.

Rodríguez-Sánchez A. C. 2003. Forraje verde hidropónico: cómo producir con facilidad, rapidez y óptimos resultados. Ed. Diana. México D. F.

Romero-Lara, C. E. 2000. Efecto del pastoreo con ovinos sobre la concentración de taninos condensados en *Gliricidia sepium* (Jacq) Walp en el trópico seco, Universidad de Colima, Colima, México.

Romero Valdez, M. E., Córdova Duarte, G. y Hernández Gallardo, E. O. 2009. Producción de forraje verde hidropónico y su aceptación en ganado lechero. Acta Universitaria, vol. 19 no. 2, págs. 11-19.

Romo Rebollar E. 2010. Evaluación de diferentes materiales de plástico en sustitución de charolas convencionales utilizadas en la obtención de forraje verde hidropónico, Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UMSNH. México.

Rotger, C. A. 2004. Fermentación ruminal degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intenso (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencia Animal).

Ruiz, G. S. 1999. Hidroponía básica: el cultivo fácil y rentable de plantas sin tierra, págs. 58-112.

Salinas-Moreno, Y., Pérez-Alonso, J. J., Vázquez-Carrillo, G., Aragón-Cuevas, F., y Velázquez-Cardelas, G. A. 2012. Antocianinas y actividad antioxidante en

maíces (*Zea mays* L.) de las razas chalqueño, elotes cónicos y bolita. *Agrociencia*, vol. 46 no. 7, págs. 693-706.

Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., Rocha Sosa M. 2003. Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, *Rev. Mex. de fitopatología*, A. C. vol. 21, no. 3, pág.

Sosa-Rubio E. E., Pérez-Rodríguez D., Ortega-Reyes L., y Zapata-Buenfil G. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos, *Tec Pecu Méx*, vol. 42, no. 2, págs. 129-144.

Soto, M. A. C., Reyes, A. S. J., Ahumada, J. A. R., Cervantes, M. G., Lozano, R. G. R. y Barragán, H. B. 2012. Producción de biomasa y valor nutricional del forraje verde hidropónico de trigo y avena. *Interciencia*, vol. 37 no.12, págs. 906-913.

Tiemann T. T., Ávila P., Ramírez G., Hess H. D., Lascano C. E. 2006. Efecto de taninos extraídos de leguminosas arbustivas sobre la dinámica de fermentación ruminal en Hess H. D., Gómez J., Lascano C. E., Segundo Taller Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, págs. 15-17.

Tierranegra-García, N., Salinas-Soto, P., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velázquez, R. V., Rico-García, E., Mendoza-Diaz, S. O., y Guevara-González, R. G. 2011. Effect of foliar salicylic acid and methyl jasmonate applications on protection against pill-bugs in lettuce plants (*Lactuca sativa*). *Phytoparasitica*, vol. 39 no. 2, págs. 137-144.

Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T. y Takabe, T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, vol. 163 no. 3, págs. 515-523.

Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant animal. Cornell University Press, Ithaca, Nex York.

Van Soest, P. J., Robertson J. y Lewis B. A. 1991. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and noostarch polysaccharides in reallion to animal nutrition. J. Dairy Sci, vol. 74, págs. 3583-3594.

Vargas J., Cárdenas E., Pabón M. y Carulla J. 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo, Archivos de zootecnia, vol. 61, págs. 51-66.

Vargas Rojas G. 2011. Botánica general: desde los musgos hasta los árboles, Editorial Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica.

Vasta, V., Mele, M., Serra, A., Scerra, M., Luciano, G., Lanza, M., y Priolo, A. 2009. Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. Journal of animal science, vol. 87 no. 8, págs. 2674-2684.

Villegas-Castañeda M., Meneses-Mayo M., Miranda-Romero L. A. y Loera-Corral O. 2010. Reducción de gas in vitro y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos lignilotíficos, Agrociencia, vol. 44 no. 8, págs. 917-929.