

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA

PROGRAMA DE POSGRADO

EFEECTO DEL SECADO Y METODO DE ANALISIS SOBRE LOS ESTIMADOS
DE TANINOS Y LA RELACION DE ESTOS CON LA DIGESTIBILIDAD *IN*
VITRO DE ALGUNOS FORRAJES TROPICALES.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Por

SILVIA VALERIO CHAVES

Turrialba, Costa Rica

1990

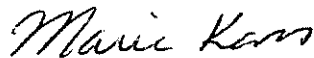
Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

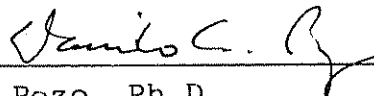
COMITE ASESOR:



Francisco Romero, Ph.D.
Profesor Consejero

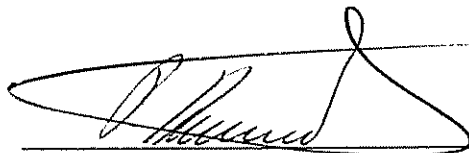


María Kass, Ph.D.
Miembro del Comité



Danilo Pezo, Ph.D.
Miembro del Comité

Miembro del Comité



Ramón Lastra, Ph.D.
Coordinador Programa Posgrado



Silvia Valerio Chaves
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres, **Jose Rafaél y Norma**, por su esfuerzo, abnegación y perseverancia por ayudarme en mi superación personal, y por haberme inculcado el respeto por otros y el amor a la naturaleza.

A **Jose**, mi esposo, por su paciencia y apoyo incondicionales, sin cuya comprensión y estímulo no podría haber alcanzado las metas propuestas.

AGRADECIMIENTOS

- A los Doctores Francisco Romero, María Kass y Danilo Pezo, consejero principal y miembros del comité asesor, respectivamente, por su apoyo y aporte en la dirección, realización y revisión de la presente tesis; mi sincero agradecimiento a ellos por su invaluable amistad.
- Al Proyecto AFN/Laboratorio de Nutrición Animal y al CATIE por costearme parcialmente los gastos de los estudios de maestría.
- Al Proyecto Use of Poro (*Erythrina ssp*) and Madero Negro (*Gliricida sepium*) as a protein source for dairy cattle (AID-SCI 936-5542-12) por su colaboración en la publicación de la presente tesis.
- Al Proyecto Sistemas Silvopastoriles CATIE-CIID por la invaluable colaboración en la ejecución de esta tesis.
- A todos los profesores del Area de Ganadería Tropical y del CATIE, en general, por compartir sus conocimientos, así como a todos los trabajadores de la Finca Ganadera del CATIE que de una u otra forma estuvieron relacionados con mi estancia en esta institución.
- Al Lic. Gerardo Rodríguez, responsable del Laboratorio de Nutrición Animal del Area de Ganadería Tropical del CATIE, cuyos conocimientos y aportes fueron decisivos en el presente trabajo.
- A la Ing. Circe Ramirez con quien comparto una bella amistad, le agradezco por su hospitalidad y su apoyo desinteresado.
- A Frank López, Luis Carlos Saborío y Erick López quienes compartieron conmigo el trabajo de campo y laboratorio, motivando siempre con su jovialidad.
- A todos los compañeros y amigos de promoción, especialmente a la Ing. Beatriz Sandoval por compartir su amistad y momentos especiales en esta institución.
- A todas aquellas personas que hicieron posible la realización y conclusión de esta tesis, a todas ellas un sincero agradecimiento.

BIOGRAFIA

El día 16 de setiembre de 1964, en la ciudad de San José, Costa Rica, nace la autora de este trabajo. Entre los años de 1971 a 1981 realiza sus estudios primarios y secundarios. En 1982 ingresa a la Universidad de Costa Rica graduándose en 1986 como Bachiller en Biología. Un año después, es nombrada encargada del laboratorio de Botánica de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica. En ese mismo año, presta sus servicios como profesora de Botánica a la Escuela Centroamericana de Ganadería ubicada en Atenas, Costa Rica; y a su vez ingresa a la Sección de Patología Experimental del Hospital México, Costa Rica. En el año de 1988 laboró en el Centro de Investigaciones Marinas de la Universidad de Costa Rica.

En setiembre de ese año, inicia sus estudios de posgrado en el Programa de Producción y Desarrollo Agropecuario Sostenido del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), obteniendo el grado de Magister Scientiae con énfasis en Nutrición Animal, en diciembre de 1990.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
BIOGRAFIA	V
CONTENIDO	VI
RESUMEN	IX
SUMMARY	XI
LISTA DE CUADROS	XIII
APENDICE	XVI
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA.	4
2.1. Constitución química y distribución de los taninos.	4
2.2. Clasificación de los taninos.	5
2.2.1. Taninos hidrolizables.	5
2.2.2. Taninos condensados.	6
2.3. Taninos como factores antinutricionales.	8
2.4. Otros efectos no detrimentales de los taninos.	12
2.5. Algunas metodologías utilizadas para la cuantificación de taninos.	13
2.5.1. Prueba de Folin-Denis.	14
2.5.2. Método gravimétrico con iterbio.	14
2.5.3. Método de n-butanol en medio ácido.	15
2.5.4. Método de vanilina en medio ácido.	16
3. MATERIALES Y METODOS.	19
3.1. Localización y características generales del área experimental.	19
3.2. Manejo general del ensayo.	20

3.2.1. Experimento 1. Adaptación de las metodologías de análisis de taninos a las condiciones del Laboratorio de Nutrición Animal, CATIE.	20
3.2.1.1. Variables de respuesta	22
3.2.2. Experimento 2. Efecto del secado y método de análisis sobre los estimados de taninos y la relación de estos con la digestibilidad de algunos forrajes tropicales.	22
3.2.2.1. Muestras experimentales	22
3.2.2.2. Tratamientos	25
3.2.2.3. Variables de respuesta	26
3.2.2.4. Diseño experimental y análisis estadístico	26
4. RESULTADOS Y DISCUSION.	29
4.1. Experimento 1. Adaptación de las metodologías de análisis de taninos a las condiciones del Laboratorio de Nutrición Animal, CATIE.	29
4.1.1. Método de Vanilina en medio ácido.	29
4.1.2. Método de n-Butanol en medio ácido.	33
4.1.3. Método de Iterbio (Ytterbium).	40
4.1.3. Método de Folin-Denis (Folin Ciocalteu).	44
4.2. Experimento 2. Efecto del secado y método de análisis sobre los estimados de taninos y la relación de estos con la digestibilidad de algunos forrajes tropicales	45
4.2.1. Análisis de varianza para cada una de las diferentes metodologías evaluadas.	46
4.2.2. Relación entre los estimados de taninos obtenidos por las diferentes metodologías evaluadas.	63
4.2.3. Relación entre los estimados de taninos obtenidos por las metodologías evaluadas y la digestibilidad de los forrajes analizados.	68

5. CONCLUSIONES.	74
6. RECOMENDACIONES.	76
7. LITERATURA CONSULTADA.	77
8. APENDICE.	85

VALERIO, S. 1990. Efecto del secado y método de análisis sobre los estimados de taninos y la relación de estos con la digestibilidad *in vitro* de algunos forrajes tropicales.

Palabras Claves : Taninos, leguminosas tropicales, análisis de fenoles, Iterbio, Folin-Denis, Vanilina, Butanol, valor nutritivo.

RESUMEN

Se evaluó el efecto que pueden tener los métodos de secado de la muestra sobre los estimados de taninos en forrajes tropicales. Así como la relación de la concentración de taninos presente en un forraje con la digestibilidad *in vitro* de los mismos.

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Nutrición Animal del Area de Ganadería Tropical, del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Constó de dos experimentos que utilizaron muestras de forrajes tropicales.

En la primera investigación se estudiaron diferentes metodologías para cuantificar taninos, con respecto a su factibilidad de ser utilizadas en el laboratorio de Nutrición Animal del CATIE.

En el segundo experimento, las muestras utilizadas consistieron en hojas de 20 especies forrajeras (19 de ellas leguminosas), tanto arbóreas como herbáceas, de las cuales se conocía la DIVMS. A estas muestras se les analizó el contenido de taninos por 4 diferentes métodos (Folin-Denis, Determinación gravimétrica con iterbio, Butanol en medio ácido y Vanilina en medio ácido), evaluando para cada método el efecto del tipo de secado sobre los estimados de taninos (secado en horno a 60 °C y liofilizado: extracción de humedad al vacío a baja temperatura).

Las especies que más se vieron afectadas por el tipo de secado fueron *Desmodium ovalifolium*, *Albizia sp*, *Inga sp* y *Flemingia macrophylla*, para los diferentes métodos de análisis. En general, las arbóreas evaluadas no se vieron afectadas por el secado, cuando se analizaban por los métodos de Folin-Denis y n-Butanol ($P < 0.01$).

Las especies herbáceas utilizadas no se vieron afectadas por el secado al trabajar con la prueba de Iterbio, sin embargo, si existió interacción del secado con especies ($P < 0.01$). Para la prueba de Iterbio, una mayor cantidad de especies se ven afectadas por el método de secado, que en el resto de los métodos.

Las mejores correlaciones entre los resultados obtenidos para cada uno de los métodos se dieron entre las siguientes pruebas: Folin-Denis e Iterbio, Folin-Denis y n-Butanol, n-Butanol y Vanilina.

La mejor correlación obtenida entre DIVMS y contenido de taninos, cuando se consideraron las 20 especies independientemente del secado, se dió entre ambas variables para el método de Folin-Denis ($r=-0.82$), y en segundo lugar, por el método de Iterbio ($r=-0.77$). La mejor correlación entre DIVMS y taninos para especies herbáceas se dio en los metodos de Folin-Denis, Iterbio, Butanol. Para especies arbóreas fue Folin-Denis .

VALERIO, S. 1990. Effect of drying and methods of analysis on the estimates of tannins and the relation between this and IVDMD of some tropical forages.

Key words: Tannins, tropical legumes, phenol analysis, Ytterbium, Folin-Denis, Vanillin, n-Butanol, nutritive value.

SUMMARY

The effect of different drying methods on the tannin content estimates of some tropical forages, and the relationship between tannin concentration and in vitro dry matter digestibility (IVDMD) were evaluated.

Two experiments were carried out at CATIE'S Nutrition Laboratory and the Dairy Experimental Farm, in Turrialba, Costa Rica. In the first investigation, different methods to analyze tannin content were evaluated and adequated to the conditions of the Animal Nutrition Laboratory at CATIE.

In the second study, the samples used consisted in leaves of twenty forage species (19 of which were legumes). IVDMD was known. Tannin contents were analyzed by four methods (Folin-Denis, gravimetric assay using Ytterbium, butanol-HCl assay and Vanillin-HCl assay), considering for each method the effect of sample drying (Freeze-dried and oven-dried).

The species that were most affected by kind of drying: *Desmodium ovalifolium*, *Albizia sp.*, *Flemingia macrophylla*.

For different methods of analysing in general, the trees studied were not affected by the drying, when using Folin-Denis (FD) and Butanol (BUT) assays ($P > 0.01$).

The herb species used, were not affected by drying when working with Ytterbium. However, interaction between drying and species existed.

For Ytterbium (YB) assay, a mayor quantity of species were affected by drying method than in the rest of the methods.

The best correlations between the results for each one of the methods were given by the following: FD-YB, FD-BUT, BUT-VAN.

FD and YB presented the best correlation ($r = -0.82$ and $r = -0.77$) obtained between IVDMD and tannin content when the 20 species were considered (independently from drying method).

The best correlation between IVDMD and tannin content for herb species was given in the methods of FD, YB and BUT; for tree species was FD.

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Lista de especies evaluadas, hábito de crecimiento y digestibilidad in vitro de la materia seca promedio (DIVMS).	23
Cuadro 2.	Relaciones entre compuestos y productos para el método Secuencial de Detergentes	34
Cuadro 3.	Promedios de los estimados de taninos condensados para dos leguminosas por el método de FDN con N-butanol, con y sin secado de la fibra.	37
Cuadro 4.	Promedios de los estimados de taninos condensados para dos leguminosas por el método de N-butanol, con dos tiempos de hervido.	38
Cuadro 5.	Resumen del análisis de Varianza para las diferentes metodologías considerando las veinte especies	47
Cuadro 6.	Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies arbóreas por el método de Folin-Denis	48
Cuadro 7.	Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies herbáceas por el método de Folin-Denis	48
Cuadro 8.	Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies arbóreas por el método de Iterbio	50
Cuadro 9.	Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies herbáceas por el método de Iterbio	50
Cuadro 10.	Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies arbóreas por el método de n-Butanol	51
Cuadro 11.	Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies herbáceas por el método de n-Butanol	51

Cuadro 12.	Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies arbóreas por el método de Vanilina.	52
Cuadro 13.	Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies herbáceas por el método de Vanilina.	52
Cuadro 14.	Resumen del análisis de Varianza para las diferentes metodologías por tipo de especie (arbóreas y herbáceas)	54
Cuadro 15.	Contenido de taninos en especies arbóreas obtenidos por el método de Folin-Denis	56
Cuadro 16.	Contenido de taninos en especies arbóreas obtenidos por el método de n-Butanol	56
Cuadro 17.	Clasificación de las especies arbóreas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Vanilina (según prueba de Duncan).	58
Cuadro 18.	Clasificación de las especies arbóreas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de n-Butanol (según prueba de Duncan).	58
Cuadro 19.	Clasificación de las especies herbáceas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Vanilina (según prueba de Duncan).	59
Cuadro 20.	Clasificación de las especies herbáceas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de n-Butanol (según prueba de Duncan).	59
Cuadro 21.	Clasificación de las especies arbóreas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Folin-Denis (según prueba de Duncan).	60
Cuadro 22.	Clasificación de las especies arbóreas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Iterbio (según prueba de Duncan).	60
Cuadro 23.	Clasificación de las especies arbóreas con base en los resultados de digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) según prueba de Duncan.	61

Cuadro 24. Clasificación de las especies herbáceas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Folin-Denis (según prueba de Duncan).	62
Cuadro 25. Clasificación de las especies herbáceas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Iterbio (según prueba de Duncan).	62
Cuadro 26. Clasificación de las especies herbáceas con base en los resultados de digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) según prueba de Duncan.	63
Cuadro 27. Coeficientes de correlación lineal entre metodologías para el análisis de contenido de taninos, en 20 especies forrajeras ($P < 0.01$).	65
Cuadro 28. Coeficientes de correlación lineal entre los resultados obtenidos para cada metodología de análisis de taninos por tipo de especie ($P < 0.01$)	66
Cuadro 29. Coeficientes de correlación lineal entre los resultados para cada metodología de análisis de taninos, por secado.	67
Cuadro 30. Coeficientes de correlación lineal entre los resultados para cada metodología de análisis de taninos, por tipo de especie y por secado ($P < 0.01$)	67
Cuadro 31. Coeficientes de correlación lineal entre digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) y concentración de taninos para los diferentes métodos de análisis.	69
Cuadro 32. Coeficientes de correlación lineal entre digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) y concentración de taninos para los diferentes métodos de análisis y formas de secado.	69
Cuadro 33. Coeficientes de correlación lineal entre DIVMS y concentración de taninos para los diferentes métodos de análisis, formas de secado y hábito de crecimiento	70
Cuadro 34. Ecuación de regresión lineal para las diferentes metodologías de cuantificación de taninos.	72

Cuadro 35. Ecuación de regresión lineal para las diferentes metodologías de cuantificación de taninos.	72
Cuadro 36. Ecuación de regresión logarítmica para algunas metodologías de cuantificación de taninos.	73

LISTA DE ANEXOS

	Página
A1. Método de Folin-Denis.	86
A2. Método de Butanol.	88
A3. Método Gravimétrico de Iterbio.	90
A3. Método de Vanilina.	93

1. INTRODUCCION

Existe una serie de compuestos producto del metabolismo no esencial de las plantas que están presentes sólo en algunas especies en particular. Estos metabolitos secundarios están relacionados con problemas tales como la toxicidad potencial de algunas plantas forrajeras, deficiencias inducidas y efectos adversos sobre la respuesta animal, cuando estas especies son consumidas (Burns, 1978; Lowry, 1989).

Los taninos y compuestos fenólicos relacionados representan algunos de estos compuestos secundarios. Aparentemente, su función principal en la planta es la de evitar la depredación por bacterias, hongos y herbívoros en general, aunque se han desarrollado principalmente como respuesta al ataque de insectos (Cope *et al*, 1971; Lane y Schuter, 1981; Van Soest, 1982; Lowry, 1989). Algunos rumiantes han desarrollado mecanismos de detoxificación para estos compuestos a partir de la coevolución que pudo haber existido entre estos animales y plantas con alta concentración de taninos (Minson y Hegarty, 1984).

La ocurrencia de taninos en plantas forrajeras tropicales es de gran interés debido a que estas sustancias

pueden afectar el rendimiento animal. La presencia de taninos ha sido asociada con el control del timpanismo en rumiantes (Sarkar *et al*, 1976), mejoras en la utilización de la proteína como proteína sobrepasante (Preston y Leng, 1987; Galindo *et al*, 1989), así como una reducción en la palatabilidad o apetecibilidad y en la digestibilidad de algunos forrajes (Broadhurst y Jones, 1978).

Se ha reportado que algunas de las leguminosas forrajeras tropicales que presentan altos contenidos de taninos en sus hojas y ápices son varias especies de los géneros *Acacia*, *Inga*, *Albizia* y *Desmodium* (Govindarajan y Mathew, 1965; Reed *et al*, 1982; Reed *et al*, 1985; Reed, 1986). Sin embargo, existe escasez de información respecto a la identificación, cuantificación y mecanismos de acción de estos metabolitos en plantas tropicales, que si han sido ampliamente estudiados en leguminosas de clima templado (Minson y Hegarty, 1984).

Varios autores puntualizan la necesidad de realizar estudios con métodos analíticos mejorados para la determinación cuantitativa de los compuestos fenólicos que disminuyen el valor nutritivo del forraje tropical (Van Soest *et al*, 1985; Mueller-Harvey *et al*, 1987), tomando en cuenta los diferentes objetivos de cada una de las metodologías utilizadas.

Con base en estas consideraciones se plantearon los siguientes objetivos :

-Evaluar la factibilidad de utilizar algunas metodologías para la cuantificación de taninos en el laboratorio de Nutrición Animal de el CATIE.

-Determinar el efecto que pueden tener los métodos de secado de la muestra sobre los estimados de taninos en forrajes tropicales.

-Relacionar la concentración de taninos presente en un forraje con la digestibilidad *in vitro* de los mismos.

2. REVISION DE LITERATURA

Muchas plantas forrajeras tropicales, tanto arbóreas como herbáceas, se caracterizan por contener una elevada cantidad de compuestos fenólicos. Generalmente, las sustancias fenólicas tienden a ser solubles en agua y frecuentemente se encuentran en combinación con azúcar como glicósidos, localizándose principalmente, en vacuolas celulares o formando parte estructural de los tejidos vegetales (Harborne, 1984). Dentro de estos compuestos fenólicos se encuentran los taninos.

Los taninos han sido utilizados en la industria para dar textura y sabor a algunos alimentos (Govindarajan y Mathew, 1965), así como para curtir cueros y maderas (Yague, 1969). En Colombia, el guamo (*Inga spectabilis*) produce más del 30% de los taninos usados para curtiembre de cueros (Torres, 1986).

2.1. Constitución química y distribución de los taninos

Los taninos se presentan ampliamente distribuidos en plantas vasculares, su ocurrencia en angiospermas está particularmente asociada con tejidos leñosos (Haslam, 1966). En la célula vegetal los taninos se localizan separadamente de las proteínas y enzimas del citoplasma, pero cuando el tejido es dañado, se liberan los taninos y reaccionan con

las proteínas haciéndolas menos accesibles al animal (Harborne, 1984).

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua, de pesos moleculares variados pero superiores a 500 y con la propiedad de precipitar proteínas e inhibir algunas enzimas (Jones *et al* 1976; Pichard *et al* 1989).

Algunos autores (Bate-Smith, 1973; Ferreyra y Tomás, 1984; Van Soest *et al*, 1985; Lowry, 1989) mencionan que otras características presentadas por los taninos son:

1. Poseen propiedades antimicrobiales que podrían afectar la tasa de fermentación ruminal.
2. Producen un sabor amargo o astringente.
3. Tienen la capacidad de poder unirse a carbohidratos y otros polímeros no protéicos.

2.2. Clasificación de los taninos

Los taninos se clasifican convencionalmente en dos grupos principales: a) taninos hidrolizables, entre los que se encuentran los ellagitaninos y los galotaninos y b) taninos condensados, los que incluyen a las proantocianidinas y a los flavonoides (Haslam, 1978; Van Soest *et al*, 1985)

2.2.1. Taninos Hidrolizables

Los taninos hidrolizables son ésteres complejos cuyo núcleo es una glucosa rodeada por varias combinaciones de

ácidos polifenólicos, que pueden ser hidrolizados en medio alcalino o ligeramente ácido (Van Soest *et al.*, 1985). McLeod (1974) indica que estos taninos también pueden ser hidrolizados por acción enzimática, produciendo algunos residuos azucarados así como ácido fenilcarboxílico, y pueden polimerizarse con taninos ya condensados para formar flavonoides poliméricos.

Según Lowry (1989), los taninos hidrolizables pueden ser encontrados en muchas familias vegetales, casi en su totalidad en especies leñosas. En contraste, Harborne (1984) menciona que los taninos hidrolizables además de estar limitados a dicotiledoneas, se encuentran en pocas familias. Aparentemente están relacionados con toxicidad en *Quercus havardii* (Norteamérica), *Terminalia oblongata* (Australia) y *Clidemin hirta* en Asia (Lowry, 1989). En todos estos casos, menciona el autor, los taninos se encontraban a altos niveles (15-30% del peso seco de la hoja).

2.2.2. Taninos Condensados

Los taninos condensados ocurren casi universalmente en helechos y gimnospermas, aunque también están ampliamente distribuidos entre las angiospermas, básicamente en especies leñosas (Harborne, 1984).

Esta clase de taninos puede clasificarse en dos tipos: proantocianidinas y leucoantocianidinas. Las primeras son producto de la condensación de flavan-3-oles (catequinas), mientras que los últimos son complejos de flavan-3,4-ol. Según Harborne (1984), el término leucoantocinidinas se usó anteriormente para referirse a los taninos condensados en general, pero en la actualidad se reserva para los monoméricos flavan-3,4-dioles, que muchas veces carecen de algunas características asociadas con este tipo de taninos.

Feeny (1968), reportó que el ataque más severo realizado a hojas de roble por el insecto *Operophteria brumata*, ocurrió cuando los taninos hidrolizables se encontraban en alta concentración y los taninos condensados en baja cantidad. Cuando la concentración de taninos condensados se incrementó en las hojas, el consumo de las mismas disminuyó drásticamente.

Según Barry *et al* (1986), las concentraciones de taninos condensados (TC) aumentan cuando la planta se encuentra sometida a algún tipo de estrés, debido a que fueron desarrollados como mecanismos de defensa contra el ataque de bacterias, hongos y más tarde, contra insectos y herbívoros (Robbins *et al*, 1987). Es así como algunas especies de *Lotus* producen altas concentraciones de TC cuando son cultivadas en suelos de baja fertilidad, lo que se considera como una adaptación para reducir la defoliación

causada por herbívoros, en condiciones donde la producción de materia seca es baja (Barry y Manley, 1984)

2.3. Taninos como factores antinutricionales

Como ya se mencionó anteriormente, muchos de los forrajes y leguminosas de clima tropical contienen taninos, los cuales son unos de los principales factores anticualitativos de este tipo de forrajes.

La disminución en el consumo de alimento y el efecto adverso sobre la digestibilidad son algunos de los mayores problemas producidos por estas sustancias las que así afectan el rendimiento de los animales. McLeod (1974) determinó que una de las razones de la reducción en el consumo de alimentos que contienen taninos es el efecto astringente de estos compuestos fenólicos. Por lo tanto, los taninos presentes en los tejidos vegetales, al ser "liberados" a través de la masticación, pueden formar complejos con las mucoproteínas presentes en la saliva así como con aquellas de la superficie bucal, disminuyendo la facilidad de tragar el alimento, debido a efectos sobre la lubricación bucal (Mole y Waterman, 1987). Otros estudios corroboran este efecto que tienen los taninos al reaccionar con mucoproteínas presentes en la saliva causando astringencia (Tamir y Alumot, 1969; Martin-Tanguy *et al*, 1977; Bate-Smith, 1977).

En estudios realizados con yuca (*Manihot esculenta*), Reed *et al* (1982) encontraron que además de los glicósidos cianogénicos presentes en sus hojas, los taninos eran un factor que limitaba el valor nutritivo de las mismas. Según estos autores, los altos contenidos de proteína cruda ligada a la fibra detergente neutro indicaron que la proteína cruda presente en las hojas de esta planta se comportaba de manera diferente, en términos de digestibilidad de la proteína respecto a otros forrajes, debido a la posible formación de complejos indigestibles entre taninos y proteínas o a los efectos de los taninos sobre la actividad enzimática.

Barry y Duncan (1984) estudiaron los efectos de los taninos condensados sobre la digestibilidad de *Lotus pedunculatus* en ovejas, concluyendo que los efectos detrimentales se deben a su reacción con las enzimas microbiales en el rumen o a la unión con las enzimas secretadas en el intestino delgado.

La influencia de los taninos sobre varias de las reacciones enzimáticas ruminales, y por ende en el metabolismo que ocurre en ese compartimento, ha sido estudiado en detalle (Feeny, 1969; Grant, 1976; Kumar y Singh 1984). Así Martin-Tanguy *et al* (1977) proponen que el efecto inhibitorio sobre la digestión de la proteína puede deberse no solo a una inhibición enzimática directa, sino también a la formación de complejos indigestibles con la

proteína proveniente del alimento, disminuyendo efectivamente la calidad del mismo. De acuerdo a Cummins (1971) y Lowry (1989), los efectos adversos sobre consumo y digestibilidad son notorios a altas concentraciones de taninos en los forrajes (arriba del 10% de fenoles totales del peso seco de la hoja) siendo tolerables las concentraciones de taninos hasta un nivel del 5%. Harborne (1984) menciona que los efectos detrimenales de taninos condensados sobre estos aspectos son importantes arriba del 2% del peso seco de la hoja.

Otros efectos negativos asociados con el consumo de forrajes que contienen taninos en altas proporciones, son sobre la tasa de crecimiento y desarrollo animal (Feeny, 1970 citado por Mole y Waterman, 1987). Según mencionan Mole y Waterman (1987), es importante reconocer que los animales pueden crecer menos con dietas que contienen taninos porque ingieren menos cantidad de alimento, digieren menos el alimento consumido, o por envenenamiento (que no es lo común). Otros estudios realizados con cabras consumiendo *Inga spectabilis*, determinaron que debido al consumo de altas concentraciones de taninos (como fenoles totales) se podía presentar un efecto cardiotoxico (Galindo *et al*, 1989).

Otro problema que ha sido asociado con un alto contenido de taninos en los forrajes es el de formar

complejos con algunos compuestos necesarios para el metabolismo del animal. Según menciona Lowry (1989), muchos de los compuestos tóxicos después de ser metabolizados en el hígado o en otros tejidos son excretados como conjugados de glicina, ácido glucorónico o sulfatos. Particularmente en el caso de los fenoles, se demostró una respuesta positiva a la suplementación con azufre al trabajar con *Acacia aneura*, que contienen altos niveles de los mismos. Ford y Hewitt (1974), encontraron que los taninos condensados también forman compuestos indisponibles con metionina.

Se han realizado muchas investigaciones utilizando el Polietilen glicol (PEG), compuesto que es efectivo para contrarrestar el efecto de los taninos condensados al formar complejos con ellos hasta la exclusión de la proteína (Pritchard *et al*, 1988). Sin embargo, su precio en el mercado es alto, haciéndolo antieconómico como suplemento (Lowry, 1989). Sin embargo, se pueden utilizar suplementos de menor precio como el azufre o hidróxido de calcio. Este último ha sido utilizado para prevenir la intoxicación por taninos hidrolizables, evitando su absorción a nivel del intestino. Estos resultados han sido corroborados en estudios realizados con cabras alimentadas a base de *Clidemia hirta*, arbusto de alto contenido de taninos (Murdiati sin publicar, mencionado por Lowry, 1989).

Muchos autores continúan preguntándose si realmente existe un problema en lo que se refiere a forrajes que contienen taninos (Mole y Waterman, 1987;). Lowry (1989) concluye que cuando el desempeño animal se ve deprimido, es debido a efectos aleloquímicos, y que estos efectos realmente existen en especies como *Calliandra callothyrsus*, *Acacia villosa*, *A. angustissima*, todas las cuales tienen alto contenido de taninos.

2.4. Otros efectos no detrimentales de los taninos

No todos los efectos producidos por la presencia de taninos son detrimentales. Cuando existen niveles bajos de taninos en forrajes, éstos pueden ser beneficiosos para los rumiantes, pues previenen el timpanismo (Marshall *et al*, 1979) y protegen a la proteína proveniente del alimento de la deaminación bacteriana (McLeod, 1974).

En estudios realizados con ovejas alimentadas a base de *Onobrychis viciifolia* se observó una mayor retención de nitrógeno y mayor cantidad de proteína proveniente del alimento alcanzando el intestino delgado, cuando se comparó con otras leguminosas de clima templado (Thompson *et al*, 1971).

En este sentido, algunos autores mencionan que en forrajes tropicales de tipo arbóreo, la presencia de

proteína enlazada a compuestos de tipo fenólico (taninos) permite escapar a la degradación ruminal como proteína sobrepasante, siendo una fuente importante de proteína de alta calidad biológica para rumiantes (Preston y Leng, 1987; Galindo *et al*, 1989).

Barry (1985) mencionado por Barry *et al* (1986), considera que los niveles ideales de taninos condensados es de 20 a 40 g/Kg de la materia seca de la dieta, siendo detrimentales a más de 76 g/Kg. Por lo tanto, se debe proveer de plantas ricas en taninos solamente como suplemento, menos del 25% de la materia seca de la dieta, evitándose los problemas que podrían acarrear altas concentraciones de estos compuestos (Barry y Manley, 1984).

2.5. Algunas metodologías utilizadas para la cuantificación de taninos

Varios métodos han sido utilizados para cuantificar y caracterizar los taninos presentes en un determinado material. La siguiente clasificación de estos métodos es brindada por Van Soest *et al* (1985), basándose en las propiedades físico-químicas de los analitos:

- 1.precipitación de taninos con proteína
- 2.formación de productos coloreados
- 3.oxidación de taninos
- 4.mediciones con Rayos ultravioleta (u.v.).

A continuación se mencionan algunas pruebas que cuantifican la presencia de taninos en las plantas.

2.5.1. Prueba de Folin-Denis

La prueba del ácido fosfomolibdico o de Folin Denis es una prueba no específica para algún tipo determinado de taninos, y se basa en la medición espectrofotométrica del ácido fosfomolibdico que se reduce al oxidarse los taninos y fenoles relacionados a los taninos presentes en la muestra (Reicher *et al*, 1981). El resultado se expresa como "equivalentes de ácido tánico", pues se utiliza este ácido como patrón (Burns, 1963).

El compuesto activo del reactivo de Folin-Denis, al quedar reducido por los compuestos fenólicos en solución ácida, origina una sal azul cuando se adiciona un álcali (Lowry *et al*, 1951). Los compuestos formados son estables por un par de horas, disminuyendo lentamente después de ese período (Reicher *et al*, 1981). Estos mismos autores concluyen que es un método que puede ser fácilmente utilizado para análisis de extractos vegetales, pues se considera que la sensibilidad del método es alta y el compuesto coloreado es estable, reflejándose en la repetibilidad de los resultados.

2.5.2. Método gravimétrico con iterbio

Otro método es el conocido como "precipitación con Iterbio", el cual se basa en la precipitación de fenoles

relacionados con taninos debido a la afinidad de éstos con elementos denominados "tierras raras", en condiciones de pH neutro o alcalino (Van Soest *et al*, 1985). Reed *et al* (1985) describen este método como una técnica para la determinación gravimétrica de fenoles solubles, que puede también ser utilizada para realizar ensayos de absorbancia con luz ultravioleta (u.v.), de colorimetría, precipitación con proteína e inhibición de celulasa.

Según los resultados obtenidos por Reed *et al* (1987), el iterbio trivalente puede ser utilizado en la determinación cuantitativa de fenoles solubles presentes en las hojas de especies forrajeras. Sin embargo, dichos autores enfatizan que es necesario realizar más trabajos para estudiar las interacciones del iterbio con proteínas, compuestos no fenólicos, solvente, como también de los efectos de estas interacciones sobre la eficiencia de precipitación.

2.5.3. Método de n-Butanol en medio ácido

La prueba de n-butanol ha sido ampliamente utilizada. Es un método específico para taninos condensados, básicamente para la determinación de proantocianidinas. Estas han sido tradicionalmente determinadas por su conversión en antocianidinas en solución mineral ácida, tanto de tejidos molidos como de extractos vegetales (Bate-

Smith, 1954; Porter *et al.*, 1986). Estos principios se han hecho universales en la determinación de proantocianidinas, utilizando alcohol butílico o alcohol amílico como medio de extracción (Harborne, 1984).

El método más usado emplea el n-butanol en medio ácido en una proporción de 95:5 v/v, donde la muestra es hervida y posteriormente leída en el espectrofotómetro. Este procedimiento fue originalmente propuesto por Swain y Hillis (1959), aunque Bate-Smith (1973) hizo mucho por aumentar su popularidad.

Se han realizado varios estudios para evaluar esta metodología. Porter *et al.* (1986), mencionan que es un método de alta repetibilidad donde, sin embargo, existen efectos sobre la producción de antocianidinas debido a impurezas de trazas de metales y la presencia de agua en la solución. Los mismos autores reportan que la producción de antocianidinas (que reflejan la cantidad de proantocianidinas presentes en la muestra) no se ven afectadas por la luz que incide sobre ellas, aún después de varias horas de ocurrida la reacción.

2.5.4. Método de vanilina en medio ácido

Por último se menciona un método específico para la determinación de taninos condensados conocido como Método de

Vanilina en medio ácido (Vanillin-hydrochloric acid method). Es un método que se basa en los trabajos realizados por Bate-Smith y Lerner (1954), siendo específica para leucoantocianidinas y catequinas de los extractos de tejidos vegetales (Burns, 1963). Esta metodología se basa en la precipitación de las proantocianidinas y leucoantocianidinas en medio ácido y su posterior comparación, en términos de absorbancia, con un patrón que generalmente es catequina o ácido tánico. Burns (1963), menciona que este método tiene la ventaja de que es específico para los compuestos que en plantas se les atribuye el efecto de astringencia e inhibición de celulasa.

Lo estimados de taninos por el método de vanilina tal y como se plantea en este trabajo no deben tomarse como absolutos, sino como una medida para comparar las diferentes especies, en otras palabras, para determinar cual especie tiene mayor cantidad y cual tiene menor. El solo hecho de realizar el método a la luz del día sin proteger los tubos A (muestra más reactivos) y B (blanco) con papel de aluminio, se disminuyen en 23% los estimados de concentración de taninos después de 60 minutos de comenzada la reacción colorimétrica, esto es, después de mezclar los reactivos (Broadhurst y Jones, 1978).

Los estimados de taninos determinados por el método de vanilina también se ven afectados por la temperatura o las variaciones de la misma a través del día. En

investigaciones realizadas por Broadhurst y Jones (1978) se observó hasta un 6% de variación en los resultados de reacciones llevadas a cabo a 20°C comparadas con otras a 15°C. Según estos autores las variaciones en la temperatura (15-25°C) afectan en mayor proporción a la tasa de reacción que la estabilidad del complejo formado, requiriendo de más tiempo para alcanzar el máximo de absorbancia a menores temperaturas (e.i. a 15°C requiere de 35 minutos; a 25°C necesita de 12.5 minutos para la misma muestra).

Varios autores argumentan que los problemas relacionados con los métodos apropiados de análisis tienen que ver con el manejo previo de la muestra, y la alteración que sufre ésta desde la colecta hasta el análisis (Bate-Smith, 1973), pues de la mayoría de los compuestos presentes en una planta, tal vez los taninos son los más difíciles de mantener y preservar (Haggerman y Butler, 1978; Feeny, 1968; Cope *et al*, 1971). Además algunos trabajos demuestran que los valores de polifenoles varían ampliamente según la metodología analítica utilizada para la determinación de los mismos (Ferreyra y Tomás, 1984).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización y características generales del area experimental.

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Nutrición Animal del Area de Ganadería Tropical, del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

El trabajo se dividió en dos experimentos que utilizaron muestras de forrajes obtenidas en el Centro de Cría e Investigación "Los Diamantes" del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) situado en Guápiles, Costa Rica. Dicha estación se localiza a 10°13' latitud norte y 83°47' longitud oeste, a una altitud de 250 m.s.n.m. La temperatura media anual es de 24.6 °C, la precipitación pluvial media anual es de 4532.7 mm, con una humedad relativa media de 87%, y el ecosistema es clasificado como Bosque Topical Lluvioso (Roig, 1989). También se colectaron muestras en el Ensayo Regional A del CIAT, ubicado en Balsa de Atenas, Costa Rica. Este ensayo se localiza a 9°59' de latitud y 84°23' de longitud, a una altitud de 696 m.s.n.m. con una precipitación pluvial promedio anual de 999.9 mm (Rojas *et al*, 1977). Finalmente, tres especies de leguminosas fueron colectadas en la Finca Experimental del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), el cual se encuentra situado a 9°53' latitud norte

y a 83°38' de longitud oeste, a una altitud de 602 m.s.n.m. La temperatura media anual es de 22.1 °C, con una humedad relativa de 90.4% y una precipitación media anual de 2599.4 mm distribuida a lo largo de todo el año (CATIE, 1987) y corresponde a una zona de vida de Bosque Muy Húmedo Premontano según la clasificación de Holdridge (1978).

3.2. Manejo general del ensayo

3.2.1. Experimento 1. Adaptación de las metodologías de análisis de taninos a las condiciones del Laboratorio de Nutrición Animal, CATIE.

En el primer ensayo se estudiaron diferentes metodologías para cuantificar taninos, con respecto a su factibilidad de ser utilizadas en el Laboratorio de Nutrición Animal.

La primera metodología con que se trabajó fue la propuesta por Price *et al* (1978) conocida como Método de Vanilina en medio ácido. Las pruebas preliminares se realizaron con muestras de diferentes árboles forrajeros, secadas al horno de aire forzado, que se tenían almacenadas en el laboratorio. Las muestras habían sido molidas a 1mm, diámetro que se utiliza en la mayoría de análisis rutinarios de laboratorio.

El método de Vanilina tal y como se siguió en los análisis posteriores se presenta en el apéndice. Las modificaciones realizadas al mismo se discuten en el capítulo de Resultados y Discusión.

La segunda metodología con que se trabajó fue con el Método gravimétrico de Iterbio, basándose en el procedimiento planteado por Van Soest *et al*, 1985 (ver apéndice).

La tercera metodología fue escogida después de realizar varias pruebas con muestras de 2 plantas que contenían valores extremos de concentración de taninos, determinados anteriormente, por el método de vanilina, estas fueron *Calliandra callothyrsus* (alto contenido de taninos) y *Stylosanthes gulanensis* (bajo contenido de taninos). Los métodos que se estudiaron y evaluaron fueron los siguientes: el Método secuencial doble por medio de detergentes (Van Soest *et al*, 1985), el Método de fibra detergente neutra tratada con butanol (Reed, 1986; Reed y Kebede, 1987), y el Método de n-butanol conocido también como Prueba de n-Butanol en medio ácido (Harborne, 1986). Este último se describe en detalle en el apéndice 1.

Finalmente se trabajó el Método de Folin Denis, utilizando el reactivo comercial conocido como Reactivo de Folin Ciocalteu para fenoles, de la casa comercial Sigma (ver apéndice).

Todos los métodos colormétricos necesitaron de blancos para corregir los estimados de taninos, debido a que pueden existir otros compuestos o pigmentos que absorben la longitud de onda utilizada, alterando los resultados finales.

3.2.1.1. Variables de respuesta

La concentración de taninos se estimó como porcentaje en base a la materia seca de la muestra para los métodos de Vanilina, Folin Denis e Iterbio, y como unidades de absorbancia por gramo de muestra (Abs₅₅₀/grM) para el método de n-Butanol.

3.2.2. Experimento 2. Efecto del secado y método de análisis sobre los estimados de taninos y la relación de estos con la digestibilidad de algunos forrajes tropicales.

3.2.2.1. Muestras experimentales

Las muestras que se utilizaron consistieron en hojas de 20 diferentes especies forrajeras (19 de ellas leguminosas), tanto arbóreas como herbáceas, de las cuales se conocía de antemano, la digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) correspondiente. Nueve especies arbóreas (de 3 meses de rebrote) fueron colectadas en el Centro de Cría e Investigación "Los Diamantes" del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Guápiles. Ocho de las especies herbáceas

(de 8 meses de rebrote) se colectaron en el ensayo del CIAT, Atenas. *D. ovalifolium*, *A. pintoi*, *Inga sp* fueron colectadas en la Finca experimental del CATIE, Turrialba. Las especies utilizadas en este estudio, tipo a que pertenecen (hábito de crecimiento) y respectiva digestibilidad determinada para las diferentes especies en el presente ensayo, se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Lista de especies evaluadas, hábito de crecimiento y digestibilidad in vitro de la materia seca promedio (DIVMS).

Especies	Habito Crec.	DIVMS(%)
<i>Acacia angustissima</i>	arbórea	23.2
<i>Albizia sp.</i>	arbórea	23.0
<i>Albizia falcataria</i>	arbórea	42.4
<i>Arachis pintoi</i>	herbácea	62.0
<i>Calliandra callothyrsus</i>	arbórea	21.0
<i>Centrosema brasilianum</i>	herbácea	51.5
<i>Centrosema macrocarpum</i>	herbácea	54.0
<i>Centrosema pubescens</i>	herbácea	52.6
<i>Codariocalyx gyroides</i>	herbácea	58.4
<i>Cratylia floribunda</i>	herbácea	45.3
<i>Desmodium ovalifolium</i>	herbácea	31.6
<i>Difiza sp</i>	arbórea	59.3
<i>Erythrina fusca</i>	arbórea	49.5
<i>Erythrina poeppigiana</i>	arbórea	50.8
<i>Flemingia macrophylla</i>	herbácea	19.6
<i>Gliricidia sepium</i>	arbórea	57.8
<i>Guazuma ulmifolia</i>	arbórea	44.8
<i>Inga sp</i>	arbórea	23.2
<i>Stylosanthes capitata</i>	herbácea	61.1
<i>Stylosanthes guianensis</i>	herbácea	57.1

Promedios en base a 6 observaciones
e.e. = 1.09

Las muestras colectadas se colocaron en bolsas de plástico oscuras cerradas. Luego se transportaron dentro de

cajas térmicas con hielo hasta el laboratorio, donde se dividió cada muestra en 2 partes iguales (submuestras). Cada submuestra siguió una diferente forma de secado, que se describe a continuación:

1. Secado en una estufa con flujo de aire forzado a 60 °C, hasta alcanzar peso constante (aproximadamente 48 h.).

2. Liofilizado (también se conoce como "freeze-dried" o extracción de humedad al vacío a -20 °C). La muestra fresca fue introducida en balones de vidrio (aproximadamente 100 gr de muestra fresca o congelada) que luego se colocaba en el liofilizador por un período de tiempo que variaba de 4 a 8 días, dependiendo de la humedad presente en la muestra, hasta dejarla deshidratada.

El secado al horno fue realizado inmediatamente después de que las muestras fueron llevadas al laboratorio. En el caso de las submuestras que debían ser liofilizadas, la gran mayoría fue congelada a -20 °C hasta el momento en que debían ser secadas, debido a que no existía capacidad en la liofilizadora para contener a todas las submuestras.

Conforme las submuestras se secaban eran colocadas en 5 bolsas de plástico oscuras selladas con calor. Estas bolsas contenían partes iguales de dicha submuestra, de esta manera solo se abría la bolsa que era necesaria para cada método de

análisis. Todas las bolsas fueron almacenadas en una habitación a 17°C.

Se procedió a moler cada submuestra a 1mm en un molino de martillo, el mismo día o el día anterior al análisis de laboratorio. Se aplicaron las siguientes metodologías para el análisis cuantitativo de taninos:

- a. Método de Folin Dennis (Burns, 1963).
- b. Determinación gravimétrica por medio de precipitación con Iterbio (Reed *et al*, 1985; Van Soest *et al*, 1985).
- c. Método de n-butanol en medio ácido (Harborne, 1984).
- d. Método de Vanilina en medio ácido (Price *et al*, 1978).

Cada una de las metodologías se consideró independientemente, evaluándose dentro de ellas los dos métodos de secado.

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) se realizó mediante la técnica de Tilley y Terry (1963). Esta determinación se hizo sobre todas las especies (20), repetición (3) y métodos de secado (2) estudiados.

3.2.2.2. Tratamientos

Para cada un de los ensayos los tratamientos fueron dos

métodos de secado por cada especie, como se muestra a continuación:

Metodología 1 (M1: Folin Denis)	Secado en horno (S1) Liofilizado (S2)
Metodología 2 (M2: Iterbio)	Secado en horno (S1) Liofilizado (S2)
Metodología 3 (M3: n-Butanol)	Secado en horno (S1) Liofilizado (S2)
Metodología 4 (M4: Vanilina)	Secado en horno (S1) Liofilizado (S2)

3.2.2.3. Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y la concentración de taninos (totales o condensados según la metodología utilizada) medida como porcentaje de la materia seca de la hoja o como unidades de absorbancia por gramo de muestra (Abs₆₅₀/grM).

3.2.2.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño de parcelas divididas, con tres repeticiones. La parcela grande correspondió a cada especie y la subparcela quedó definida por el método de secado, realizando un análisis estadístico independiente para cada

una de las cuatro metodologías (M1, M2, M3, M4). Se efectuó un análisis de regresión de la concentración de taninos sobre la DIVMS.

El modelo estadístico asociado al diseño empleado y el análisis de varianza correspondiente se representan a continuación:

$$Y_{ij} = U + A_i + E_a + S_j + AS_{ij} + E_b$$

donde:

Y_{ij} = Concentración de taninos para el j-ésimo método de secado, en la i-ésima especie forrajera.

U = Media general

A_i = Efecto de la i-ésima especie.

E_a = Error a.

S_j = Efecto de la j-ésimo método de secado.

AS_{ij} = Efecto de la interacción especie por método de secado.

E_b = Error b.

El análisis de varianza se realizó siguiendo el procedimiento de Modelos Lineales Generalizados (GLM) del paquete de análisis estadístico SAS (SAS, 1982; SAS, 1985). Con el mismo paquete estadístico se llevaron a cabo las

correlaciones y regresiones entre metodologías y entre las variables planteadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

En la primera parte de los resultados se discute y describe la forma en que se adecuaron y finalmente se eligieron las metodologías que serían utilizadas posteriormente en la cuantificación o estimación de la concentración de los taninos presentes en los forrajes colectados.

La segunda parte se refiere a los estimados de la concentración de taninos obtenidos con cada uno los métodos de análisis y su posible relación con la digestibilidad *in vitro* de la materia seca, así como el efecto del secado sobre dichos estimados dependiendo del tipo de forraje analizado.

4.1. Adaptación de las metodologías de análisis de taninos a las condiciones del Laboratorio de Nutrición Animal, CATIE.

4.1.1. Método de Vanilina en medio ácido.

Este método es específico para taninos condensados (proantocianidinas y leucoantocianidinas), (Burns, 1969; Sarkar *et al*, 1976). Broadhurst y Jones (1978) indican que el método de vanilina es atractivo por su especificidad y sensibilidad para taninos condensados pero que sufre de baja

reproducibilidad entre muestras, días y laboratorios. Muchos investigadores han realizado nuevos intentos de mejorar este aspecto en el método (Price et al, 1978; Desphande y Cheryan, 1985). Dichos trabajos fueron realizados principalmente con grano de algunas variedades de sorgo y frijol común (*Phaseolus vulgaris*), donde la repetibilidad del método continuaba siendo una de las limitantes en estos análisis. A pesar de este inconveniente, se reevaluó el método en este estudio usando varios forrajes tropicales, debido a que hay varios investigadores que lo utilizan.

En las primeras pruebas efectuadas con el método de Vanilina en medio ácido, no fue centrifugado el tubo donde se estaba realizando la extracción de fenoles en metanol (Apéndice 1. Método de Vanilina en medio ácido). Esto ocasionó cierta contaminación debido a partículas observada en la solución, que al momento de ser leída en el espectrofotómetro se tradujo en valores muy variados aún entre los duplicados. Posteriormente se decidió centrifugar mejorando sensiblemente los resultados, aunque aún así existieron algunos forrajes que causaron mayores problemas en la lectura que otros. En estos existían interferencias que no podían ser eliminadas ni por centrifugación ni usando algodón como filtro a la hora de tomar las alicuotas de la muestra (ver apéndice). En general, se tuvo que repetir

varias veces los análisis para esos forrajes problemáticos (e.i. *Gliricidia sepium*, *Stylosanthes guianensis*).

En todos los análisis realizados, el metanol que sirve para extraer los taninos condensados, fue agregado a temperatura ambiente. Se agitaron los tubos durante 45 minutos en vez de 20 minutos como es recomendado por Price *et al* (1978), pues en la literatura consultada, los tiempos de extracción utilizados varían desde 10 minutos (Deshpande y Cheryan, 1985), hasta 24 horas (Maxson y Rooney, 1971; Rickard, 1986). Cabe mencionar que Price *et al* (1978) encontraron en estudios realizados con sorgo, que usando el metanol puro (al 100% como solvente) no se mostraban incrementos en los taninos extraídos después de algunos minutos, considerando como óptimo 20 minutos de extracción, aunque los valores de las lecturas se mantuvieron estables aún cuando el tiempo de extracción era de una hora. Por estas razones se consideró que manteniendo un tiempo de extracción intermedio (45 min.) no afectaría significativamente los estimados de taninos.

Sin embargo, Deshpande y Cheryan (1985), en trabajos realizados con algunas variedades de frijol común, mencionaron que una ligera disminución en los valores de taninos podía ser observada cuando se incrementaba el tiempo de extracción, debido a una posible oxidación de los mismos. Además encontraron que las curvas de absorbancia eran

diferentes para cada variedad de frijol. En base a estas afirmaciones, sería conveniente determinar para algunos de los forrajes evaluados en el presente trabajo, los tiempos de extracción óptimos para utilizar con ellos.

Cuando las concentraciones de la muestra más el reactivo de vanilina (A) y la del blanco (B) eran similares, se notó que muchas veces este último era mayor que el valor de la lectura de A, originando una lectura neta negativa. En general, esto sucedió en especies con concentraciones de taninos extremadamente bajas (determinadas como tal por otros métodos de análisis).

Se encontró que existe error de lectura en gran proporción debido a que esta no es estable, lo común era una variación de hasta 20 unidades (ppm) de un duplicado a otro, probablemente por las interferencias que antes se mencionaron. Otros casos donde no existió coincidencia entre duplicados fueron los de especies bajas en contenido de tanninos condensados, como *Centrosema brasillianum*, *C. macrocarpum*, *Stylosanthes guianensis* y *Gliricidia sepium*.

Se encontró que una misma muestra coloreada (mismo tubo o alícuota) podía variar en la lectura hasta en 50 o más unidades si era releída poco tiempo después (2-5 minutos) de la primera lectura. Esto pudo haber estado relacionado con el tiempo necesario para la estabilización o desarrollo del

color. Deshpande y Cheryan (1985), encontraron que los patrones de absorbancia para *Phaseolus vulgaris* tenían pequeñas diferencias según la variedad. Aparentemente, en los primeros 5 a 10 minutos del ensayo ocurría una reacción rápida entre los taninos y el reactivo de vanilina, sin embargo, el ámbito de absorción óptima era variable (de 15-25 minutos para la variedad Pinto y de 2-12 minutos para la variedad "black beauty"). Con base en esto se puede asumir que el patrón de absorbancia difiere entre especies y accesiones por lo cual los 20 minutos que se recomienda usar para completar la reacción colorimétrica no sería el óptimo para todos los forrajes analizados. En algunos casos podría corresponder a la zona en que la curva de absorbancia comienza a declinar o bien donde no se ha completado dicha reacción.

4.1.2. Método de n-Butanol en medio ácido

Al inicio del estudio se había propuesto trabajar con un método que ha sido ampliamente difundido para la determinación del valor nutritivo de forrajes, como lo es el sistema de detergentes, que permite el fraccionamiento de la pared celular en sus componentes. Esta técnica aplicada a la determinación de taninos se basa en la solubilidad ligera que tienen éstos en soluciones de detergente, variando con la aplicación de detergente ácido o detergente neutro en diferentes secuencias y secando posteriormente los residuos

(Van Soest *et al*, 1985). En los ensayos preliminares se trabajó con 2 especies de leguminosas, *Calliandra callothyrus* (de alto contenido de taninos) y *Stylosanthes guianensis* (de bajo contenido de taninos). Las relaciones existentes entre los diferentes compuestos para originar los productos de interés para la prueba secuencial de detergentes se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Relaciones entre compuestos y productos para el método Secuencial de Detergentes

-
1. RDN - (DN_DA): hemicelulosa + proteína ligada a pared celular + taninos solubles en detergente ácido después de detergente neutro.
 2. RDN - (DA_DN): hemicelulosa + proteína ligada a pared celular + complejos de taninos insolubles en detergente neutro pero solubles en detergente ácido.
 3. RDA - (DA_DN): pectina + sílica + taninos complejos solubles en detergente neutro después de detergente ácido.
 4. RDA - (DN_DA): productos polimerizados por secado del residuo de detergente neutro y resistentes a detergente ácido + complejos de taninos insolubles en detergente neutro e insolubles en detergente ácido
 5. (DN_DA) - (DA_DN): complejos de taninos formados en detergente insolubles en detergente ácido + complejos de taninos insolubles en detergente neutro después de detergente ácido.

RDA: residuo detergente ácido (fibra detergente ácido)

RDN: residuo detergente neutro (fibra detergente neutro)

(DN_DA): residuo deterg. ácido después de hacer deterg. neutro sobre la muestra

(DA_DN): residuo deterg. neutro después de hacer deterg. ácido sobre la muestra

Este método fue desechado debido a que es muy laborioso (poco práctico), y que no se logró que existiera repetibilidad alguna entre duplicados ni entre corridas. Esto se debió principalmente a que existieron problemas en el filtrado de la fibra detergente ácida para algunas de las muestras. Además, se perdió gran cantidad de muestra al aplicar las diferentes secuencias de detergente (e.e. a la fibra ácido detergente -RDA- se le aplicó el procedimiento de detergente neutro quedando un residuo muy pequeño y vice versa). Por otro lado, es necesario realizar una nueva revisión de las relaciones existentes entre las secuencias de detergentes (cuadro 2), pues existen dudas sobre la veracidad de estas relaciones y los productos que de ellas se desprenden cuando estas son llevadas a la práctica.

Luego se procedió a trabajar con el método propuesto por Reed (1986), en el que la fibra detergente neutra (determinada por el método de Goering y Van Soest, 1970) es tratada con ácido clorídrico al 5% en n-Butanol a 95°C por una hora. Por medio de este procedimiento es posible determinar las proantocianidinas insolubles en detergente neutro.

Reed y Tedla (1987) consideran que es importante conocer la proporción en que se encuentran presentes los taninos condensados (proantocianidinas) en la fibra detergente neutra (pared celular), ya que es posible que

estos compuestos interfieran en la utilización de la celulosa por medio de los microorganismos ruminales, debido a formación de complejos con los carbohidratos estructurales o con enzimas de los mismos microorganismos, disminuyendo así la digestibilidad de la fibra.

La prueba de n-butanol fue efectuada sobre la fibra detergente neutro (FDN) de *Calliandra callothyrsus* y *Stylosanthes guianensis*. Se realizaron ensayos preliminares tomando en cuenta el tipo de filtro que se utiliza para recoger la fibra y el proceso final de esta (secada a 100°C o sin secar).

Se usó papel de filtro y crisoles de Gooch para filtrar, determinando de esta manera, si existían diferencias entre los tipos de filtrado, debido a residuos de papel cuando era extraída la muestra de FDN. Para fines de la prueba de n-butanol, no se encontró diferencias importantes en este sentido. Sin embargo, si se observó diferencias en el contenido de taninos condensados en relación con el proceso final de la fibra, incrementándose hasta en un 26% para *C. callothyrsus* y en 29% para *S. guianensis* cuando la fibra no era secada en el horno a 110°C después de ser filtrada (Cuadro 3). Con base a estos datos preliminares, se puede decir que los taninos presentes en la fibra detergente neutra se ven afectados negativamente por el calor.

Cuadro 3. Promedios de los estimados de taninos condensados para dos leguminosas por el método de FDN con N-butanol, con y sin secado de la fibra.

Especie	100°C	Absso/gFDN*	
			sin secar
<i>C. callothyrsus</i>	45	57	+5
<i>S. guianensis</i>	17	24	+2

* valores promedio para 8 observaciones.

Para realizar análisis de rutina, en donde deben analizarse de 30 a más muestras diferentes por corrida, se consideró que el método FDN tratada con butanol no era conveniente debido a que el proceso de realizar la FDN requería de mucho tiempo y además no existía capacidad para efectuar la cantidad de muestras por corrida que se analizan en este laboratorio. Por lo tanto, se evaluó el mismo procedimiento, pero usando lo que se denominó "muestra original" (sin tipo alguno de tratamiento) en vez de la FDN, que cuenta con la ventaja de que es posible conocer, de esta manera, el contenido total (aproximado) de proantocianidinas en determinado material, en términos de absorbancia. Realizado en esta forma, el método de n-butanol ha sido ampliamente utilizado en la determinación de proantocianidinas presentes en tejidos vegetales con ciertas modificaciones principalmente a la hora de usar algún tipo de patrón estandar en la lectura final (Harborne, 1984;

Lane y Schuster, 1981; Govindarajan y Mathew 1965; Porter *et al*, 1986).

En la literatura consultada existe discrepancia respecto al tiempo que debe ser hervida la muestra en butanol y la temperatura a que debe llevarse a cabo el proceso, por ejemplo Bate-Smith (1975) realizó las determinaciones a 95°C durante dos horas, Porter *et al* (1986) realizaron pruebas a 90°C durante 40 minutos, mientras que Butler (1982) y Rickard (1986) utilizaron un baño de agua hirviendo en la que se mantuvieron las muestras durante 1.5 horas y Jones *et al* (1976) mantuvieron el hervido durante 2 horas. Se realizaron pruebas utilizando una temperatura constante de 90°C por una hora enfriando posteriormente y leyendo a 550nm. También se realizaron otras pruebas manteniendo la misma temperatura pero con 2 horas de hervido y se pudo comprobar que se incrementaba la lectura de absorbancia hasta en un 47.4% para *C. callothyrsus* y 31% para *S. guianensis* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedios de los estimados de taninos condensados para dos leguminosas por el método de N-butanol, con dos tiempos de hervido.

Especie	Abs550/gM*		
	1 hora	2 horas	
<i>C. callothyrsus</i>	76	112	+2
<i>S. guianensis</i>	13	17	+1

* valores promedio para 6 observaciones.

Adicionalmente, fue necesario realizar evaluaciones para la determinación de un blanco adecuado para este método. Casi no se menciona en la literatura consultada el hecho de que los autores usaran o no blancos para esta prueba. Por lo tanto, se procedió a evaluar una cantidad de muestra exacta a la orinal utilizando todos los reactivos en frío (n-butanol y HCl, 95:5) siguiendo todos los pasos que la muestra evaluada originalmente, menos el de hervido, Rickard (1986) utilizó este último tipo de blanco para corregir sus resultados, en estudios realizados con yuca (*Manihot esculenta*). Se realizó otro blanco que consistió en tomar una cantidad de muestra exacta a la evaluada originalmente y se aplicó el mismo proceso de hervido con la modificación de eliminar el ácido clorídrico, o sea, hirviendo en n-butanol puro.

Para elegir el blanco que mejor se ajustó al método se siguieron tres criterios: 1) que el blanco eliminara cualquier interferencia que no se pretendiera evaluar. 2) Que siguiera el mismo procedimiento al que era sometida la muestra a evaluar. 3) Con base en los espectros que fueron que produjeron. En este último caso, el tipo de material con que se trabajó originó curvas o puntos de absorbancia muy similares en ambos blancos para la longitud de onda de interés (550nm). Aparentemente se podría usar cualquiera de los blancos para esta prueba porque el efecto de las interferencias no era muy notorio, sin embargo, con base al

segundo criterio se eligió el blanco constituido por la muestra en butanol puro a 90°C. Otra razón por la cual se decidió eliminar el HCl es debido a que este es el responsable de la reacción de hidrólisis de las proantocianidinas en antocianidinas que dan origen al color rosado o rojo de la solución cuando se hierve (Bate-Smith, 1973). Eliminando el HCl se puede controlar la posibilidad de que otros pigmentos que se disuelven en butanol puro, interfieran en las lecturas finales, sustrayendo su valor de la lectura de la muestra original.

Cabe mencionar que éste es un método muy sencillo con pocos pasos experimentales, por lo que es recomendable de utilizar cuando se tienen muchas muestras para analizar. Por otra parte, los valores de los duplicados por muestra coinciden claramente. Además, es un método al que el tiempo después del hervido no lo afecta de manera tan drástica en las lecturas como sucede con otras pruebas que se basan en reacciones colorimétricas, por ejemplo en el caso del método de Vanilina (Bressani *et al*, 1983; Tuhami *et al*, 1978; Sarkar *et al*, 1976).

4.1.3. Método de Iterbio (Ytterbium)

El acetato de iterbio trivalente es utilizado como agente para formar precipitados hidrofóbicos con fenoles relacionados con taninos y lignina (Reed y Horvath, 1982).

Esta metodología evalúa el total de fenoles solubles presentes en determinado material (Reed *et al*, 1985), aunque esta metodología podría no ser tan eficaz ya que algunos de los fenoles más comunes presentes en las hojas de algunos forrajes (e.e. el glico-flavonoide conocido como rutin) no precipitan con el acetato de iterbio (Lowry y Sumpter sin publicar, mencionados por Lowry, 1989).

Se realizaron modificaciones al método propuesto por Reed y Horvath (1982) en dos puntos principales. Se modificó la forma en que se hace la extracción de los fenoles en acetona. En vez de tritutar la muestra durante la extracción, se hicieron lavados agitando fuertemente el tubo de ensayo en un vortex, de esta forma se consideró que la metodología continuaba siendo equivalente a la que siguieron los autores mencionados (ver apéndice).

Inicialmente, se permitió que el filtrado (después de la precipitación de los fenoles) se realizara por gravedad. Sin embargo, para filtrar 60 ml de la solución se necesitó aproximadamente de 8 horas, por lo que fue desechada esta forma de filtrado. Posteriormente, se filtró al vacío, siempre utilizando el papel de filtro (Whatman No. 40) recomendado por Reed y Horvath (1982), aunque de menor diámetro, y se observó que los valores de los duplicados correspondían entre sí después de completar el proceso. Se realizó una pequeña prueba con una solución a base de iones

férricos, para determinar taninos presentes en la solución filtrada obteniéndose un resultado negativo, lo que señaló que el residuo se encontraban todos los taninos solubles que habían sido precipitados.

En la literatura consultada se recomienda lavar los precipitados con 200 ml de acetona en total alternando con lavados de agua destilada o hasta que el filtrado saliera claro (libre de clorofila). Para los análisis realizados en este estudio, se observó que 50 ml de acetona en total alternando con bastantes enjuagues de agua destilada, eran suficientes para que el filtrado saliera transparente.

Luego se evaluaron diferentes tiempos para determinar el peso constante del filtro más precipitado coincidiendo con el propuesto por Reed y Horvath (1982), de tres horas a 110°C.

Aparentemente, la materia orgánica obtenida por diferencia entre el peso seco del precipitado y las cenizas estiman los fenoles solubles precipitados con iterbio en la muestra (Reed *et al*, 1985). Sin embargo, después de realizar este procedimiento se observó que en los materiales evaluados, el nivel de cenizas presentes en las precipitados con iterbio no representaba ni el 1% de los mismos y por lo tanto este paso fue eliminado.

Los materiales evaluados en este estudio mostraron valores altos de fenoles solubles de hasta un máximo de 79% de la materia seca de la hoja, en *C. callothyrsus* y mínimo de 6% en *A. pintoii*. En el estudio efectuado por Reed *et al* (1985), se encontró que *Acacia nilotica* y *Pterolobium stellatum* contenían aproximadamente 50% de fenoles precipitados por iterbio en la materia seca de la hoja, mientras que *Cadaba farinosa* y *Acacia brevispica* contenían menos de 15%. Debido a que el iterbio precipita muchos tipos de fenoles estos valores podrían no corresponder a taninos tal y como fueron definidos, mostrando valores relativamente altos en especies que por otras metodologías han mostrado muy bajo contenido de taninos tanto condensados como hidrolizables (e.e. *A. pintoii*, *E. poeppigiana*, *G. ulmifolia*, *C. floribunda*).

Este método permitió definir claramente que especies tienen alto, medio y bajo contenido de fenoles solubles. Si se considera que es importante conocer los efectos antinutricionales o ecológicos que puedan tener los fenoles solubles, aunque éstos no necesariamente precipiten proteínas, es entonces conveniente utilizar este método para la cuantificación total de taninos (y fenoles relacionados a éstos). Además es un método sencillo que mide directamente los contenidos de fenoles sin necesidad de comparar con estadares tales como el ácido tánico o catequina (Reed *et al*, 1985).

4.1.4. Método de Folin-Denis (Prueba de Folin-Ciocalteu)

Se siguió el método utilizado en el Laboratorio de Nutrición Animal (LANA) de la Universidad de Costa Rica, el cual se basa en el propuesto por Burns (1969), donde se utiliza el reactivo de Folin-Denis. Sin embargo, en este estudio se trabajó con el reactivo de Folin-Ciocalteu cuya diferencia con el primero es su mayor sensibilidad a los fenoles (Reed y Horvath, 1982).

El reflujo de las muestras se llevó a cabo en balones de fondo redondo de 100 ml hirviendo en agua destilada por 5 horas, sin embargo, es necesario investigar más sobre este punto para determinar si se requiere de tantas horas para la extracción de los compuestos de interés, o si por el contrario se podría disminuir el tiempo de análisis.

Aparentemente, los compuestos extraídos son bastante estables (puesto que resisten 5 horas en ebullición), por lo que se efectuó la prueba de Folin-Ciocalteu en dos diferentes tiempos. Una fue realizada el mismo día en que se hizo la extracción, después de que se enfriara la solución filtrada (ver apéndice), y después de 24 horas de haber realizado la extracción. En este último período, la solución se mantuvo en el balón aforado, donde había sido filtrada, cerrándolo herméticamente y manteniéndolo en

refrigeración. No se encontró diferencias entre las lecturas realizadas entre ambos tiempos.

Las lecturas fueron realizadas 40 minutos después de agregar la solución de carbonato de sodio, sin embargo, Reed *et al* (1985), añaden el Na_2CO_3 y realizan la lectura 2 horas después cuando la lectura es estable. Algo de la variación que fue obtenida entre repeticiones podría deberse precisamente a que la reacción colorimétrica no estuviera completamente desarrollada.

Este es un método con alta repetibilidad para la determinación de fenoles totales presentes en una muestra, aunque tiene el inconveniente de que depende de un patrón estandar para obtener los resultados.

En todas las metodologías que se basan en reacciones colorimétricas, se tuvo que realizar diluciones al momento de hacer las lecturas correspondientes a muestras con alto contenido de taninos, lo cual podría estar afectando, hasta cierto punto, los estimados de taninos en especies consideradas con altos en niveles de taninos.

4.2. Efecto del secado y método de análisis sobre los estimados de taninos y la relación de estos con la digestibilidad de algunos forrajes tropicales.

Con base en los resultados anteriores se seleccionaron las siguientes metodologías para estudiar la asociación

existente entre la la concentración de taninos y la digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS).

4.2.1. Análisis de varianza para cada una de las diferentes metodologías evaluadas.

Los resultados de los análisis de varianza obtenidos para cada una de las metodologías de análisis de taninos se resumen en el Cuadro 5. Se puede observar que la variabilidad en contenido de taninos encontrado entre las 20 especies es altamente significativa ($P < 0.01$) en todas las metodologías utilizadas. Hay que recordar que el efecto de especie estaría confundido con la procedencia, edad y tipo de crecimiento (herbácea o arbustiva).

Cuando se utilizó el método de Folin-Denis (FD), que es tomado como equivalente a la prueba de Folin-Ciocalteu, la forma de secado utilizada afectó significativamente ($P < 0.05$) a los estimados de taninos (Cuadro 5.).

En este aspecto, la diferencia es altamente significativa ($P < 0.01$) para los métodos de Iterbio (IT) y de Butanol (BUT) mientras que para el método de Vanilina en medio ácido (VAN), el efecto de secado no fue significativo.

Cuadro 5. Resumen del análisis de Varianza para las diferentes metodologías considerando las veinte especies

FV	GL	FD	IT	BUT	VAN
Rep	2	0.90	0.09	0.87	0.07
Esp	19	**	**	**	**
Esp*Rep	38	0.20	0.31	**	0.22
Sec	1	*	**	**	NS
Esp*Sec	19	*	**	**	**
CV		13.57	15.11	12.77	34.87

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

NS: no significativa

La interacción de la especie por forma de secado fue altamente significativa ($P < 0.01$) para tres metodologías, siendo significativa al 5% para Vanilina. Esta interacción fue importante cuando se tomaron en cuenta tanto especies arbóreas como herbáceas (Cuadro 5).

Lo anterior indica que para algunas especies es más importante el secado que para otras. Para el método de Folin-Denis, las muestras de especies que al ser liofilizadas tuvieron un ligero aumento en los estimados de taninos en comparación con los estimados obtenidos con secado al horno, son las de *A. angustissima*, *A. falcataria*, *C. calothyrsus*, *G. ulmifolia*; mientras que las que disminuyen en este atributo son *C. gyroides*, *C. brasilianum*, *G. sepium*, *D. ovalifolium*, *C. pubescens*, *Albizia sp.*

viéndose más afectadas las últimas tres especies (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 6. Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies arbóreas por el método de Folin-Denis

Especie	Horno (60°C)	Secado	Liofilizado
<i>A. angustissima</i>	5.90		6.81
<i>Albizia sp.</i>	11.11		9.89
<i>A. falcatarea</i>	4.81		5.36
<i>C. callothyrsus</i>	10.69		11.50
<i>Difiza sp.</i>	2.67		2.73
<i>E. fusca</i>	2.34		2.48
<i>E. poeppigiana</i>	2.06		2.22
<i>G. sepium</i>	3.12		2.30
<i>G. ulmifolia</i>	1.98		2.25
<i>Inga sp.</i>	9.99		8.09

Error Estd.= 0.42

Cuadro 7. Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies herbáceas por el método de Folin-Denis

Especie	Horno (60°C)	Secado	Liofilizado
<i>Centrosema brasilianum</i>	2.06		1.65
<i>C. macrocarpum</i>	2.32		2.20
<i>C. pubescens</i>	2.26		1.17
<i>Codariocalix gyroides</i>	6.57		5.31
<i>Flemingia macrophylla</i>	6.56		6.52
<i>Cratylia floribunda</i>	1.86		1.36
<i>Stylosantes capitata</i>	3.01		3.04
<i>S. guianensis</i>	3.42		3.45
<i>Arachis pintoii</i>	2.49		2.37
<i>Desmodium ovalifolium</i>	7.13		5.34

Error Estd.= 0.26

Además, en los Cuadros 8, 9, 10, 11, 12, 13, se muestran las medias de los valores de taninos por secado, obtenidos por cada uno de los métodos de análisis (Iterbio, n-Butanol y Vanilina, respectivamente). Se observa que para Iterbio las especies que se afectaron por el secado son *Inga sp.*, *C. brasilianum*, *S. capitata*, *S. guianensis*, *D. ovalifolium* (mostrando valores menores al ser liofilizadas que al ser secadas al horno), mientras que *Albizia sp.*, *A. falcataria*, *C. calothyrsus*, *Difiza sp.*, *E. poeppigiana*, *G. sepium*, *C. macrocarpum*, *C. pubescens*, *C. gyroides*, *F. macrophylla* mostraron valores más altos (Cuadros 8 y 9).

En el método de n-Butanol los valores son expresados en unidades de absorbancia por gramo de muestra en base seca. En esos términos el efecto del tipo de secado fue más importante en *G. ulmifolia*, *F. macrophylla* con diferencias de 30 y 182 unidades respectivamente, cuando se secan al horno o se liofilizan, y 28 unidades menos cuando se liofiliza que cuando se seca al horno para *Albizia sp* (Cuadros 10 y 11).

Las especies que se ven afectadas por el secado cuando se analizan con el método de Vanilina fueron *Albizia sp.*, *Inga sp.* aumentando y *D. ovalifolium*, *A. angustissima* disminuyendo los valores de taninos estimados utilizando muestras liofilizadas (Cuadros 12 y 13).

Cuadro 8. Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies arbóreas por el método de Iterbio

Espece	Horno (60°C)	Secado	Liofilizado
<i>A. angustissima</i>	49.40		47.29
<i>Albizia sp.</i>	21.39		58.33
<i>A. falcatarea</i>	30.80		40.37
<i>C. callothyrsus</i>	55.71		75.36
<i>Difiza sp.</i>	20.35		26.18
<i>E. fusca</i>	19.29		16.45
<i>E. poeppigiana</i>	9.72		21.60
<i>G. sepium</i>	16.39		27.19
<i>G. ulmifol</i>	16.68		16.26
<i>Inga sp.</i>	49.54		45.95

Error Estd.= 2.91

Cuadro 9. Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies herbáceas por el método de Iterbio

Espece	Horno (60°C)	Secado	Liofilizado
<i>Centrosema brasilianum</i>	18.59		9.27
<i>C. macrocarpum</i>	24.45		34.78
<i>C. pubescens</i>	12.43		17.47
<i>Codariocalix gyroides</i>	24.72		37.40
<i>Flemingia macrophylla</i>	43.36		55.75
<i>Cratylia floribunda</i>	14.28		14.08
<i>Stylosantes capitata</i>	24.31		11.93
<i>S. guianensis</i>	13.11		11.43
<i>Arachis pintoii</i>	8.42		6.70
<i>Desmodium ovalifolium</i>	52.15		37.88

Error Estd.= 1.91

Cuadro 10. Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies arbóreas por el método de n-Butanol

Especie	Secado	
	Horno (60°C)	Liofilizado
<i>A. angustissima</i>	104.07	109.27
<i>Albizia sp.</i>	506.87	480.37
<i>A. falcataria</i>	115.49	135.80
<i>C. callothyrsus</i>	132.17	149.51
<i>Difiza sp.</i>	21.32	20.35
<i>E. fusca</i>	26.20	31.24
<i>E. poeppigiana</i>	16.52	24.05
<i>G. sepium</i>	65.38	55.06
<i>G. ulmifolia</i>	46.71	76.83
<i>Inga sp.</i>	614.07	616.68

Error Estd.= 13.24

Cuadro 11. Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies herbáceas por el método de n-Butanol

Especie	Secado	
	Horno (60°C)	Liofilizado
<i>Centrosema brasilianum</i>	14.92	13.95
<i>C. macrocarpum</i>	15.94	16.24
<i>C. pubescens</i>	10.57	11.13
<i>Codariocalix gyroides</i>	389.27	391.74
<i>Flemingia macrophylla</i>	277.99	459.78
<i>Cratylia floribunda</i>	12.20	13.33
<i>Stylosantes capitata</i>	23.88	32.88
<i>S. guianensis</i>	30.67	41.04
<i>Arachis pintoii</i>	94.40	106.23
<i>Desmodium ovalifolium</i>	550.51	550.84

Error Estd.= 9.89

Cuadro 12. Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies arbóreas por el método de Vanilina.

Especie	Secado	
	Horno (60°C)	Liofilizado
<i>A. angustissima</i>	4.53	2.82
<i>Albizia sp.</i>	1.20	3.34
<i>A. falcataria</i>	1.38	3.05
<i>C. callothyrsus</i>	4.14	3.68
<i>Difiza sp.</i>	0.03	0.19
<i>E. fusca</i>	0.29	0.19
<i>E. poeppigiana</i>	0.25	0.19
<i>G. sepium</i>	0.15	0.13
<i>G. ulmifolia</i>	0.34	0.17
<i>Inga sp.</i>	26.89	42.02

Error Estd.= 1.23

Cuadro 13. Resultados de la concentración de taninos obtenidos para dos formas de secado en especies herbáceas por el método de Vanilina.

Especie	Secado	
	Horno (60°C)	Liofilizado
<i>Centrosema brasilianum</i>	1.26	0.14
<i>C. macrocarpum</i>	0.64	0.17
<i>C. pubescens</i>	0.91	0.08
<i>Codariocalix gyroides</i>	4.95	5.62
<i>Flemingia macrophylla</i>	4.78	5.16
<i>Cratylia floribunda</i>	1.48	0.15
<i>Stylosantes capitata</i>	1.38	1.01
<i>S. guianensis</i>	0.79	0.13
<i>Arachis pintoi</i>	3.50	2.85
<i>Desmodium ovalifolium</i>	28.92	19.47

Error Estd = 0.34

Se puede decir que depende de la especie el que se deba o no liofilizar las muestras. Sin embargo, debe tomarse en

cuenta el costo (en términos económicos y de tiempo) de realizar un tipo de secado u otro. En la mayoría de las especies no se observó una variación muy importante que justifique la liofilización con excepción de *C. calothyrsus*, *G. sepium*, *C. macrocarpum*, *F. macrophylla* cuando se analicen por el método de iterbio.

En el Cuadro 14. se presenta el resumen de los resultados del análisis de varianza para cada una de las metodologías, por tipo de especie (arbóreas o herbáceas). En la prueba de Folin-Denis, la única fuente de variación que resultó ser significativa ($P < 0.01$) para el tipo arbóreo, fue la de especies, de estas la que presentó mayor contenido de taninos fue *C. calothyrsus* y la de menor contenido *G. ulmifolia* (Cuadro 15), aunque otras especies (*G. sepium*, *Difiza sp.*, *E. fusca*, *E. poeppigiana*) tuvieron valores semejantes a esta última. Las diferencias debido a secado e interacción especie por secado no fueron significativas.

A diferencia de las especies arbóreas, las especies herbáceas analizadas en este trabajo por el método de Folin-Denis, si se ven afectadas ($P < 0.01$) por el secado (Cuadro 14). Sin embargo, la interacción secado por especie fue importante ($P < 0.05$), siendo más susceptibles al secado las especies *C. pubescens*, *C. gyroides*, *D. ovalifolium* (Cuadro 7).

Con el método de Iterbio sucede lo contrario, fue en las especies arbóreas donde la forma de secado cambió en una manera importante los resultados de taninos ($P < 0.01$), mientras que en las herbáceas en general no hubo este efecto (Cuadro 14). Con excepción de *S. capitata*, *D. ovalifolium*, *C. brasilianum*, *C. macrocarpum*, *C. pubescens*, *C. gyroides* que si fueron afectadas significativamente ($P < 0.01$) por el secado en mayor o en menor medida (Cuadro 9).

Cuadro 14. Resumen del análisis de Varianza para las diferentes metodologías por tipo de especie (arbóreas y herbáceas)

FV	GL	FD		IT		BUT		VAN	
		arb	her	arb	her	arb	her	arb	her
Rep	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Esp	9	**	**	**	**	**	**	**	**
E*R	18	-	-	-	-	-	-	-	-
Sec	1	NS	**	**	NS	NS	**	**	**
E*S	9	NS	*	**	**	NS	**	**	**
cv		13.5	12.8	15.4	14.2	13.5	11.7	43.7	14.8

* $P < 0.05$

NS: no significativa

** $P < 0.01$

También en el Cuadro 14 se observa que las diferencias debidas al secado tampoco fueron significativas para las especies arbóreas cuando fueron tratadas con n-butanol. Se

puede notar que *Inga sp.* fue quien presentó mayor contenido de proantocianidinas (615 unidades de absorbancia por gramo de muestra, en promedio) teniendo más de 100 unidades que *Albizia sp* quien fue la siguiente especie con mayor, y casi 600 unidades más que *E. poeppigiana*, quien mostró el menor contenido de taninos condensados en todo el grupo de las especies arbóreas (Cuadro 16).

En el grupo de las herbáceas, la especie que más se vió afectada por el secado fue *F. macrophylla*, donde se encontró ($P < 0.01$) mayor cantidad de taninos cuando la muestra fue liofilizada (Cuadro 11).

Se puede apreciar que por el método de vanilina, tanto las arbóreas como las herbáceas se vieron afectadas ($P < 0.01$) por el secado (Cuadro 14). Como se mencionó anteriormente este es un método muy sensible, por lo que cualquier variación debido a la manipulación de la muestra, en este caso debido al tipo de secado, podría ser detectado por dicho método.

Es interesante hacer notar que cuando las especies se analizaron en dos grupos usando la prueba de vanilina, se observa que *Inga sp* (en el grupo de las arbóreas) fue la afectada por el tipo de secado, mientras que en las herbáceas fueron *D. ovalifolium*, *C. brasilianum*, *C. floribunda*, *C. pubescens*, *C. gyroides* (Cuadros 12 y 13).

Cuadro 15. Contenido de taninos en especies arbóreas obtenidos por el método de Folin-Denis

Especie	% Taninos como ácido tánico
<i>Calliandra calothyrsus</i>	11.10
<i>Albizia sp.</i>	10.50
<i>Inga sp.</i>	9.54
<i>Acacia angustissima</i>	6.36
<i>Albizia falcataria</i>	5.09
<i>Gliricidia sepium</i>	2.71
<i>Difiza sp.</i>	2.70
<i>Erythrina fusca</i>	2.41
<i>E. poeppigiana</i>	2.14
<i>Guazuma ulmifolia</i>	2.12

Error Estd.= 0.30

Cuadro 16. Contenido de taninos en especies arbóreas obtenidos por el método de n-Butanol

Especie	Absorbancia/gr.muestra
<i>Inga sp.</i>	615.38
<i>Albizia sp.</i>	493.62
<i>Calliandra calothyrsus</i>	140.84
<i>Albizia falcataria</i>	125.65
<i>Acacia angustissima</i>	106.67
<i>Guazuma ulmifolia</i>	61.77
<i>Gliricidia sepium</i>	60.22
<i>Erythrina fusca</i>	28.72
<i>Difiza sp</i>	20.84
<i>Erythrina poeppigiana</i>	20.29

Error Estd.= 9.36

Los coeficientes de variación encontrados para todas las metodologías fueron de alrededor del 14% (Cuadro 5), excepto para la prueba de Vanilina que fue muy alto

(c.v.=35%). Aparentemente, en este método dicha variación fue ocasionada principalmente por las especies arbóreas (Cuadro 14).

Cuando se trató de clasificar a las especies en diferentes categorías, según la concentración de taninos presentes en ellas, se observó que *Inga sp.* tuvo el mayor contenido ($P < 0.01$) de acuerdo a las pruebas de Vanilina y n-Butanol (Cuadros 17 y 18). En ambos métodos fue seguida por *D. ovalifolium* en un tipo de planta aparte ($P < 0.05$) (Cuadros 19 y 20).

Tanto los resultados obtenidos con la prueba de Folin-Denis así como los de Iterbio sugieren que *C. calothyrsus* tuvo el mayor contenido de fenoles totales (Cuadros 21 y 22).

En general se pudo notar que *F. macrophylla*, *C. calothyrsus*, *Inga sp.*, *D. ovalifolium*, *C. gyroides* y *A. angustissima* se consideran en las clases de mayor contenido de taninos. Cuando estos datos se compararon con los de DIVMS (Cuadros 23 y 26), se encontró que las especies de menos digestibilidad fueron *F. macrophylla*, *C. calothyrsus*, *Inga sp.* mostrando así el efecto negativo que sobre la DIVMS tienen las altas concentraciones de taninos.

Cuadro 17. Clasificación de las especies arbóreas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Vanilina (según prueba de Duncan).

Especie	% Taninos como Catequina
<i>Inga sp.</i>	34.45 a
<i>Calliandra calothyrsus</i>	4.07 b
<i>Acacia angustissima</i>	3.67 b
<i>Albizia sp.</i>	2.27 bc
<i>A. falcataria</i>	2.21 bc
<i>Guazuma ulmifolia</i>	0.26 c
<i>Erythrina poeppigiana</i>	0.25 c
<i>E. fusca</i>	0.24 c
<i>Gliricidia sepium</i>	0.14 c
<i>Difiza sp.</i>	0.11 c

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 18. Clasificación de las especies arbóreas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de n-Butanol (según prueba de Duncan).

Especie	Absorbancia/gr.muestra
<i>Inga sp.</i>	615.38 a
<i>Albizia sp.</i>	493.62 b
<i>Calliandra calothyrsus</i>	139.44 c
<i>Albizia falcataria</i>	125.65 c
<i>Acacia angustissima</i>	106.67 cd
<i>Guazuma ulmifolia</i>	61.77 de
<i>Gliricidia sepium</i>	60.22 de
<i>Erythrina fusca</i>	28.72 e
<i>Difiza sp.</i>	20.84 e
<i>Erythrina poeppigiana</i>	18.39 e

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 19. Clasificación de las especies herbáceas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Vanilina (según prueba de Duncan).

Espece	% Taninos como Catequina
<i>Desmodium ovalifolium</i>	25.97 a
<i>Codariocalix gyroides</i>	5.29 b
<i>Flemingia macrophylla</i>	4.97 b
<i>Arachis pintoi</i>	3.18 c
<i>Stylosanthes capitata</i>	1.20 d
<i>Cratylia floribunda</i>	0.81 d
<i>Centrosema brasilianum</i>	0.70 d
<i>C. pubescens</i>	0.49 d
<i>Stylosanthes guianensis</i>	0.46 d
<i>Centrosema macrocarpum</i>	0.40 d

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa (P<0.05)

Cuadro 20. Clasificación de las especies herbáceas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de n-Butanol (según prueba de Duncan).

Espece	Absorbancia/gr.muestra
<i>Desmodium ovalifolium</i>	549.46 a
<i>Codariocalix gyroides</i>	390.50 b
<i>Flemingia macrophylla</i>	368.89 b
<i>Arachis pintoi</i>	100.32 c
<i>Stylosanthes guianensis</i>	35.86 d
<i>S. capitata</i>	28.38 d
<i>Centrosema macrocarpum</i>	16.09 d
<i>C. brasilianum</i>	14.44 d
<i>Cratylia floribunda</i>	12.77 d
<i>Centrosema pubescens</i>	10.85 d

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa (P<0.05)

Cuadro 21. Clasificación de las especies arbóreas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Folin-Denis (según prueba de Duncan).

Especie	% Taninos como ácido tánico
<i>C. calothyrsus</i>	11.15 a
<i>Albizia sp.</i>	10.50 ab
<i>Inga sp.</i>	9.54 b
<i>Acacia angustissima</i>	6.35 c
<i>Albizia falcatoria</i>	5.08 d
<i>Gliricidia sepium</i>	2.71 e
<i>Difiza sp.</i>	2.70 e
<i>Erythrina fusca</i>	2.41 e
<i>E. poeppigiana</i>	2.17 e
<i>Guazuma ulmifolia</i>	2.12 e

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa ($P < 0.05$)

Cuadro 22. Clasificación de las especies arbóreas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Iterbio (según prueba de Duncan).

Especie	% Fenoles solubles totales
<i>Calliandra calothyrsus</i>	64.88 a
<i>Acacia angustissima</i>	48.34 b
<i>Inga sp.</i>	47.74 b
<i>Albizia sp.</i>	39.86 c
<i>Albizia falcatoria</i>	35.58 c
<i>Difiza sp.</i>	23.27 d
<i>Gliricidia sepium</i>	21.79 de
<i>Erythrina fusca</i>	17.87 de
<i>Guazuma ulmifolia</i>	16.47 de
<i>Erythrina poeppigiana</i>	14.80 e

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa ($P < 0.05$)

Al realizar la anterior clasificación según el tipo de material analizado, se observó que dentro de las arbóreas

fueron *E. poeppigiana*, *Difiza sp.*, *E. fusca*, *G. sepium* las que presentaron el menor contenido de taninos, y a su vez estas mismas especies tuvieron la mayor digestibilidad (Cuadros 17, 18, 21, 22, 23). Las herbáceas que muestran mayor contenido de taninos, coincidiendo en todas las metodologías son *D. ovalifolium*, *F. macrophylla*, *C. gyroides*. Para *C. floribunda* se observa un bajo contenido de taninos así como una baja digestibilidad (Cuadros 19, 20, 24, 25, 26).

Cuadro 23. Clasificación de las especies arbóreas con base en los resultados de digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) según prueba de Duncan.

Espece	% DIVMS
<i>Difiza sp.</i>	59.27 ^a
<i>Gliricidia sepium</i>	57.83 ^a
<i>Erythrina poeppigiana</i>	51.78 ^b
<i>E. fusca</i>	49.52 ^b
<i>Guazuma ulmifolia</i>	44.77 ^c
<i>Albizia falcatoria</i>	42.35 ^c
<i>Inga sp.</i>	23.23 ^d
<i>Acacia angustissima</i>	23.18 ^d
<i>Albizia sp</i>	22.97 ^d
<i>Calliandra calothyrsus</i>	20.68 ^d

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa ($P < 0.05$)

Cuadro 24. Clasificación de las especies herbáceas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Folin-Denis (según prueba de Duncan).

Espece	% Taninos como ácido tánico
<i>Flemingia macrophylla</i>	6.54 ^a
<i>Desmodium ovalifolium</i>	6.41 ^{ab}
<i>Codariocalix gyroides</i>	5.94 ^b
<i>Stylosanthes guianensis</i>	3.44 ^c
<i>S. capitata</i>	3.02 ^c
<i>Arachis pintoi</i>	2.43 ^d
<i>Centrosema macrocarpum</i>	2.26 ^{de}
<i>C. brasilianum</i>	1.85 ^{ef}
<i>C. pubescens</i>	1.72 ^{ef}
<i>Cratylia floribunda</i>	1.61 ^f

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa (P<0.05)

Cuadro 25. Clasificación de las especies herbáceas con base en los contenidos de taninos obtenidos por el método de Iterbio (según prueba de Duncan).

Espece	% Fenoles solubles totales
<i>Flemingia macrophylla</i>	49.55 ^a
<i>Desmodium ovalifolium</i>	46.21 ^a
<i>Codariocalix gyroides</i>	31.03 ^b
<i>Centrosema macrocarpum</i>	29.61 ^b
<i>Stylosanthes capitata</i>	18.12 ^c
<i>Centrosema pubescens</i>	14.95 ^{cd}
<i>Cratylia floribunda</i>	14.18 ^{cd}
<i>Centrosema brasilianum</i>	13.93 ^{cd}
<i>Stylosanthes guianensis</i>	12.27 ^d
<i>Arachis pintoi</i>	7.56 ^e

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa (P<0.05)

Cuadro 26. Clasificación de las especies herbáceas con base en los resultados de digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) según prueba de Duncan.

Espece	% DIVMS
<i>Arachis pintoi</i>	62.03 ^a
<i>Stylosanthes capitata</i>	60.70 ^a
<i>S. guianensis</i>	57.07 ^b
<i>Centrosema macrocarpum</i>	54.00 ^c
<i>C. pubescens</i>	52.55 ^c
<i>C. brasilianum</i>	51.53 ^c
<i>Cratylia floribunda</i>	45.33 ^d
<i>Desmodium ovalifolium</i>	31.30 ^e
<i>Codarriocalix gyroides</i>	28.45 ^f
<i>Flemingia macrophylla</i>	19.63 ^g

Letras diferentes en las columnas implican diferencia significativa (P<0.05)

4.2.2. Relación entre los estimados de taninos obtenidos por las diferentes metodologías evaluadas.

Los coeficientes de correlación lineal de la concentración de taninos obtenidos para cada una de las metodologías fueron altos, positivos y altamente significativos (P <0.01) en todos los casos (Cuadro 27). Los coeficientes de correlación lineal entre los resultados de la prueba de Vanilina y de n-Butanol fueron altos

($r=0.75$), porque ambos miden proantocianidinas. Reed *et al* (1985) coinciden con esta afirmación, aunque obtuvieron un coeficiente de correlación lineal más alto ($r=0.90$). Otros métodos que mostraron una correlación alta fueron el de Folin-Denis y el de Iterbio, probablemente debido a que ambos miden fenoles totales ($r=0.77$), pero también existió una correlación alta entre Folin-Denis y n-Butanol (Cuadro 27).

Las especies herbáceas son quienes aparentemente aumentan la correlación que existe entre la prueba de Iterbio y n-Butanol (Cuadro 28). Algo parecido sucedió con los métodos de Folin-Denis y n-Butanol, así como de este último con Vanilina, parece que las herbáceas fueron las responsables de una mayor correlación entre las metodologías (Cuadro 27). Aparentemente, para las herbáceas la mejor correlación se presentó entre Folin-Denis y n-Butanol, aunque todos los métodos correlacionaron bien para este grupo (Cuadro 28).

Cuando se refiere a los coeficientes de correlación lineal entre métodos, tomando en cuenta el secado que fue aplicado, se observa que todos tienen una correlación positiva y altamente significativa ($P < 0.01$).

Las pruebas de Folin-Denis con Iterbio para liofilizado, y Folin-Denis con n-Butanol para secado al horno, mostraron los coeficientes de correlación más altos (Cuadro 29). En el Cuadro 30 se presentan los coeficientes de correlación lineal para cada metodología tomando en cuenta el secado y el tipo de especie.

Cuando las especies arbóreas fueron secadas al horno los métodos más parecido fueron el de Folin Denis y el de n-Butanol. Las correlaciones son más altas para las especies herbáceas con cualquier tipo de secado, es decir, que se ven afectadas en forma muy similar en todos los métodos independientemente del método de secado (Cuadro 30).

Cuadro 27. Coeficientes de correlación lineal entre metodologías para el análisis de contenido de taninos, en 20 especies forrajeras ($P < 0.01$).

Método	IT	BUT	VAN
FD	0.77	0.76	0.49
IT		0.57	0.44
BUT			0.75

Cuadro 28. Coeficientes de correlación lineal entre los resultados obtenidos para cada metodología de análisis de taninos por tipo de especie ($P < 0.01$)

Método	Tipo	IT		BUT		VAN	
		arb	herb	arb	herb	arb	herb
FD	arb	0.76		0.76		0.46	
	herb		0.75		0.88		0.64
IT	arb			0.43		0.38	
	herb				0.77		0.59
BUT	arb					0.74	
	herb						0.80

En resumen, es posible apreciar que las mejores correlaciones entre los resultados obtenidos por cada uno de los métodos para cada tipo de especie, se dan entre Folin-Denis e Iterbio (FD-I), y de Folin-Denis con n-Butanol (FD-But) (Cuadros 27 y 28).

Cuando se toma en cuenta el método de secado existió una mayor correlación entre FD-I al liofilizar y cuando el secado fue al horno la mayor correlación se encontró con FD-But (Cuadro 29). Para arbóreas liofilizadas correlacionan mejor FD-I y para herbáceas secadas al horno la mayor correlación la presentan FD-But (Cuadro 30).

Cuadro 29. Coeficientes de correlación lineal entre los resultados para cada metodología de análisis de taninos, por secado.

Método	IT		BUT		VAN	
	Horno	Liof	Horno	Liof	Horno	Liof
FD	Horno	0.71	0.80		0.51	
	Liof			0.71		0.48
IT	Horno		0.54		0.62	
	Liof			0.60		0.33
But	Horno				0.78	
	Liof					0.73

Cuadro 30. Coeficientes de correlación lineal entre los resultados para cada metodología de análisis de taninos, por tipo de especie y por secado (P<0.01)

Método	IT				BUT				VAN			
	aH	aL	hH	hL	aH	aL	hH	hL	aH	aL	hH	hL
FD	aH	0.68			0.79				0.52			
	aL		0.90			0.73				0.44		
	hH			0.79			0.93				0.67	
	hL				0.74			0.87				0.59
IT	aH				0.37*				0.57			
	aL					0.51				0.26		
	hH						0.77				0.73	
	hL							0.77				0.46
BUT	aH								0.74			
	aL									0.77		
	hH										0.83	
	hL											0.81

* P<0.05

4.2.3. Relación entre los estimados de taninos obtenidos por las metodologías evaluadas y la digestibilidad de los forrajes analizados

En todos los casos se obtuvo correlaciones entre método de análisis de taninos y DIVMS negativas y altamente significativas ($P < 0.01$) (Cuadros 31, 32, 33). La mejor correlación obtenida cuando se consideraron las 20 especies sin tomar en cuenta el secado, se dió entre ambas variables para el método de Folin-Denis ($r = -0.82$), seguido por el método de Iterbio ($r = -0.77$).

Se puede observar que una correlación alta se obtuvo para Folin-Denis cuando se consideró el tipo de secado, en otras palabras, cuando la concentración de taninos era alta, tanto para secado al horno como para liofilizado, la digestibilidad era baja ($r = -0.85$ y $r = -0.80$ respectivamente). Para la prueba de Iterbio se correlacionó mejor la digestibilidad con el contenido de taninos cuando se liofilizaron las muestras (Cuadro 32).

Cuando se consideró la forma de secado además del hábito de crecimiento de la especie, se registró para las herbáceas una alta correlación (para ambos tipos de secado) entre las variables bajo estudio (Cuadro 33) para las pruebas de Folin-Denis, Iterbio y Butanol. También se muestra en el mismo cuadro, que para las herbáceas liofilizadas el mayor coeficiente de correlación se dió en el método de Iterbio ($r = -0.84$), mientras que para arbóreas liofilizadas fue en Folin-Denis ($r = -0.87$). Al considerar arbóreas secadas al

horno se observa una mayor correlación entre las variables para Folin-Denis ($r = -0.86$).

Cuadro 31. Coeficientes de correlación lineal entre digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) y concentración de taninos para los diferentes métodos de análisis.

Método	Tanino vs DIVMS	Prob
FD	-0.82	**
IT	-0.77	**
BUT	-0.73	**
VAN	-0.47	**

** $P < 0.01$
n=117

Cuadro 32. Coeficientes de correlación lineal entre digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) y concentración de taninos para los diferentes métodos de análisis y formas de secado.

Método	Secado	Tan vs. DIVMS	Prob
FD	Horno	-0.85	**
	Liof	-0.80	**
IT	Horno	-0.76	**
	Liof	-0.80	**
BUT	Horno	-0.71	**
	Liof	-0.75	**
VAN	Horno	-0.47	**
	Liof	-0.47	**

** $P < 0.01$ n= 60

Cuadro 33. Coeficientes de correlación lineal entre DIVMS y concentración de taninos para los diferentes métodos de análisis, formas de secado y hábito de crecimiento

Método	Secado	Tipo	Tan vs. DIVMS	Prob
FD	Horno	arb	-0.86	**
		herb	-0.85	**
	Liof	arb	-0.87	**
		herb	-0.73	**
IT	Horno	arb	-0.76	**
		herb	-0.74	**
	Liof	arb	-0.77	**
		herb	-0.84	**
BUT	Horno	arb	-0.64	**
		herb	-0.82	**
	Liof	arb	-0.71	**
		herb	-0.81	**
VAN	Horno	arb	-0.48	**
		herb	-0.52	**
	Liof	arb	-0.50	**
		herb	-0.48	**

** P<0.01

n= 30

Se utilizó una modelo de regresión lineal simple ($Y=mx + b$) tomando la digestibilidad *in vitro* de la materia seca

(DIVMS) como variable dependiente y los estimados de concentración de taninos obtenidos para cada metodología, como la variable independiente. Las ecuaciones para dichos modelos se muestran en los cuadros 34 y 35. Las ecuaciones de regresión lineal que mejor lograron predecir la digestibilidad de las diferentes especies **arbóreas** en base al contenido de taninos, se dieron para el método de Folin-Denis, con un $r^2= 0.82$ cuando las muestras fueron liofilizadas y $r^2= 0.78$ cuando se secaron en el horno a 60°C.

Los modelos que mejor ajustaron se dieron para la prueba de Folin-Denis. Esto puede estar relacionado con la alta cantidad de fenoles que estos forrajes (arbóreas) contienen (Preston y Leng, 1987) o debido a que las diferencias en cuanto a digestibilidad para estas especies se deben principalmente al contenido total de fenoles más que a un determinado tipo de tanino. Este mismo concepto podría aplicarse las especies herbáceas liofilizadas, donde también se cuantificaron fenoles totales por el método gravimétrico de Iterbio ($r^2= 0.75$). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el contenido de taninos condensados (proantocianidinas), obtenido por el método de n-Butanol, pueda explicar las variaciones en digestibilidad de las herbáceas cuando fueron secadas al horno ($r^2= 0.69$).

Cuadro 34. Ecuación de regresión lineal para las diferentes metodologías de cuantificación de taninos.

Relación	Intercepto	Pendiente	CV	R ²	Prob
M1T1S1	57.84	-3.49	18.99	0.78	**
M1T1S2	62.49	-4.01	18.00	0.82	**
M1T2S2	66.81	-6.37	22.43	0.60	**
M2T1S1	59.47	-0.72	24.39	0.64	**
M2T1S2	65.20	-0.65	25.00	0.66	**
M2T2S1	64.52	-0.77	20.75	0.59	**
M2T2S2	65.36	-0.81	17.64	0.75	**
M3T2S1	54.95	-0.06	18.08	0.69	**
M3T2S2	55.82	-0.06	20.28	0.67	**

M1 = Folin
M2 = Iterbio
M3 = But

T1 = arbóreas
T2 = herbáceas
S1 = horno
S2 = liof

Cuadro 35. Ecuación de regresión lineal para las diferentes metodologías de cuantificación de taninos.

Relación	Intercepto	Pendiente	CV	R ²	Prob
M1S1	61.46	-4.08	17.78	0.75	**
M1S2	61.73	-4.22	21.13	0.68	**
M2S1	62.55	-0.76	21.63	0.62	**
M2S2	63.97	-0.67	20.89	0.69	**
M3S1	50.71	-0.05	24.45	0.52	**
M3S2	52.83	-0.06	24.71	0.56	**

M1 = Folin
M2 = Iterbio
M3 = But

S1 = horno
S2 = liof

Cuadro 36. Ecuación de regresión logarítmica para algunas metodologías de cuantificación de taninos.

Relación	Intercepto	Pendiente	CV	R ²	Prob
M3T1S1	4.75	-0.27	7.22	0.62	**
M3T1S2	5.02	-0.31	7.20	0.66	**
M4T1S1	3.53	-0.17	6.87	0.65	**
M4T1S2	3.62	-0.19	6.71	0.71	**
M4T2S1	3.96	-0.22	6.77	0.48	**
M4T2S2	3.73	-0.12	9.47	0.30	**

T1 = arbóreas

S1 = horno

T2 = herbáceas

S2 = liofilizado

M3 = Butanol

M4 = Vanilina

En el Cuadro 36 se muestran los valores obtenidos para el modelo de regresión logarítmica ($Y = be^{mx}$), para el método de Vanilina debido a que los datos se ajustaron mejor a este tipo de modelo exponencial que al lineal. En estos casos se podría explicar la forma en que a partir de cierta concentración de proantocianidinas el efecto sobre la digestibilidad se hace más marcado. En este sentido cabe mencionar, que en ambas metodologías se observa la influencia de grupos extremos ("leading groups"), por lo que no se consideran confiables las conclusiones que puedan ser obtenidas en base a estos modelos.

5. CONCLUSIONES

-Las especies que más se ven afectadas por el tipo de secado son *Desmodium ovalifolium*, *Albizia sp*, *Inga sp* y *Flemingia macrophylla*, para los diferentes métodos de análisis.

-En general, las arbóreas evaluadas no se ven afectadas por el secado, cuando se analizan por los métodos de Folin-Denis y n-Butanol.

-Las especies herbáceas utilizadas no se ven afectadas por el secado al trabajar con la prueba de Iterbio, sin embargo, si existe interacción del secado con especies.

-Para la prueba de Iterbio, una mayor cantidad de especies se ven afectadas por el método de secado, que en el resto de los métodos.

-Las mejores correlaciones entre los resultados obtenidos para cada uno de los métodos se dan entre las siguientes pruebas: Folin-Denis e Iterbio, Folin-Denis y n-Butanol, n-Butanol y Vanilina.

-La mejor correlación obtenida entre DIVMS y contenido de taninos, cuando se consideraron las 20 especies independientemente del secado, se dió entre ambas variables

para el método de Folin-Denis, y en segundo lugar, por el método de Iterbio.

-La mejor correlación entre DIVMS y taninos para especies herbáceas se dio en los métodos de Folin-Denis, Iterbio, Butanol. Para especies arbóreas fue Folin-Denis.

6. RECOMENDACIONES

-Proponer ensayos de consumo con las especies que se clasificaron como altas en contenidos de taninos, para determinar su efecto sobre el consumo y rendimiento animal.

-Evaluar la utilización del ensilaje de especies con alto contenido de taninos, para determinar si con este proceso se disminuye la concentración de tales, hasta un punto en que no afecte el desempeño animal.

-Realizar pruebas de cinética de la reacción para especies con alto contenido de taninos condensados para determinar cuanto tiempo de hervido es recomendado utilizar por el método de n-Butanol y de Folin-Denis.

-Evaluar, con diferentes materiales, las metodologías que fueron estudiadas para determinar a largo plazo (3, 6, 12 meses después de molido la muestra) en cuanto varían los estimados de taninos, determinando a su vez si pueden explicar sus diferencias en cuanto a digestibilidad, así como la confiabilidad de los resultados en estos plazos.

-Realizar análisis con muestras en fresco, para determinar su variación respecto a las muestras que son secadas.

7. LITERATURA CONSULTADA

- BARRY, T.N.; DUNCAN, S.J. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. I. Voluntary intake. British Journal of Nutrition 51:485-491.
- ; MANLEY, T.R.; DUNCAN, S.J. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. I. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. British Journal of Nutrition. 55:123-137.
- ; MANLEY, T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritive value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and protein. Br. J. Nutr. 51:493-504.
- ; REID, C.S.W. 1984. Nutritional effects attributable to condensed tannins, cyanogenic glycosides and oestrogenic compounds in New Zealand forages. IN Forage Legumes for Energy-Efficient Animal Production: Proceedings of a Trilateral Workshop held in Palmerston North, New Zealand. Eds. R. Barnes; P.R. Ball; R.W. Broughman; G.C. Marten; D.J. Minson. USA Agricultural Research Service. p.251-259.
- BATE-SMITH, E.C. 1973. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. Phytochem. 12:907-912.
- 1973. Tannins of herbaceous leguminosae. Phytochem. 12:1809-1812.
- 1975. Phytochemistry of Proanthocyanidins. Phytochem. 14:1107-1113.
- ; LERNER, N.H. 1954. Leuco-Anthocyanins: 2. Systematic distribution of leuco-anthocyanins in leaves. Biochem. 58:126-132.
- 1977. Astringent tannins in *Acer* species. Phytochem. 16:1421-1426.

- BEART, J.E.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. 1985. Plant polyphenols-secondary metabolism and chemical defence 24 (1):33-38.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; WOLZAK, A.; HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. 1983. Tannin in common beans: methods of analysis and effects on protein quality. J.Food Sci. 48:1000-1001.
- BROADHURST, R.B.; JONES, W.T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. J.Sci.Fd Agric. (32): 788-794.
- BURNS, J.C. 1978. Symposium: Forage quality and animal performance (Antiquality factors as related to forage quality). J.Dairy Sci. 61: 1809-1820.
- . 1984. Antiquality factors in temperate legumes in the United States. *IN* Forage Legumes for Energy-Efficient Animal Production: Proceedings of a Trilateral Workshop held in Palmerston North, New Zeland. Eds. R. Barnes; P.R. Ball; R.W. Broughman; G.C. Marten; D.J. Minson. USA Agricultural Research Service. p.260-267.
- BURNS, R.E. 1963. Methods of tannin analysis for forage crop evaluation. Georgia Agricultural Exp. Stations Technical Bulletin N.S. 32: 1-14.
- . 1971. Method for estimation of tannin in grain sorghum. Agron. J. 63:511-512.
- CATIE. 1987. Efecto de la edad de rebrote sobre la digestibilidad in situ de *E. berteroana* y *G. sepium*. *In* Proyecto Sistemas Silvopastoriles para el Trópico Húmedo Bajo, CATIE/CIID 3-P-85-0016: Segundo informe anual. Turrialba, C.R., CATIE. p. 90-106.
- COPE, W.A.; BELL, T.A.; SMART, W.W.G. 1971. Seasonal changes in an enzyme inhibitor and tannin content in *Sericea lespedeza*. Crop Science. 11: 893-895.
- CUMMINS, D.G. 1971. Relationships between tannin content and forage digestibility in sorghum. Agronomy Journal 63: 500-502.

- DESPHANDE , S.; CHERYAN, M. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. J.Food Sci. 50(4):905-911.
- FEENY, P.P. 1969. Inhibitory effect of oak leaf tannins on the hidrolisis of protein by tripsin. Phytochem. 8:2119-2126.
- ; BOSTOCK, H. 1968. Seasonal changes in the tannin content of oak leaves. Phytochem. 7: 871-880
- FERRYRA, R.; TOMAS, J. 1984. Contenido de polifenoles en manzanas (Red delicious) y cambios en los mismos durante el almacenamiento refrigerado. Agroquim. Tecnol. Aliment. 24(2): 278.
- FORD, J.E.; HEWIT,D. 1974. Protein quality in cereals and pulses. 2. Influence of polyethyleneglycol on the nutritional availability of methionine in sorghum (*Sorghum vulgare* pers.), field beans (*Vicia fuba* L.) and barley. Br. J. Nutr. 42:317-323.
- GALINDO, W.F.; ROSALES, M.; MURGUEITIO,E.; LARRAHONDO, J. 1989. Sustancias a 1989. Sustancias a
 nutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. Investigación Pecuaria para el Desarrollo Rural. 1(1):37-48.
- GOERING, H.D.; VAN SOEST, P.J. 1979. Forage fiber analysis. Agr. Handbook No. 379. U.S.D.A., Washington, D.C.
- GONVINDARAJAN, V.S.; MATHEW,A.G. 1965. Anthocyanidins from leucoanthocyanidins. Phytochem. 4:985-988.
- GRANT, W.D. 1976. Microbial degradation of condensed tannins. Science. 193: 1137-1139
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. J.Agric.Food Chem. 26 (4): 809-812.
- HARBORNE, J.B. 1984. Phytochemical methods. Segunda edición. Chapman and Hall, New York. pp.37-99.

- HASLAM, E. 1966. Chemistry of vegetable tannins. Academic Press, London. 177p.
- . 1978. Vegetable tannins. In: The biochemistry of plants. Eds. P.K. Stumpf; E.E. Conn. Academic Press Inc., London. p.p.475-522.
- HOLDRIDGE, L.R. 1978. Ecología basada en las zonas de vida. San José, C.R., IICA. 206p.
- JONES, W.T.; BROADHURST, R.B.; LITTLETON, J.W. 1976. The condensed tannins of pasture legume species. Phytochem. 15: 1407-1409.
- ; MANGAN, J.L. 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. J.Sci.Fd.Agric. 28:126-136.
- KARCHESY, J.J.; LOVELAND, P.M.; LAVER, M.L.; BAROESKY, D.F.; BAROESKY, E. 1976. Condensed tannins from the barks of *Alnus rubra* and *Pseudotsuga menziesh*. Phytochem. 15:2009-2010.
- KASS, M.L.; RODRIGUEZ, G. 1987. Manual de evaluación nutricional de pastos y forrajes. Turrialba, C.R., CATIE, Depto. de Producción Animal. 48p.
- KUMAR, R.; SINGH, M. 1984. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. J. Agric. Food Chem. 32: 447-453.
- LANE, H.C.; SCHUSTER, M.F. 1981. Condensed tannins of cotton leaves. Phytochem. 20:425-427.
- LOWRY, H.O.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193:265-266.
- LOWRY, J.B. 1989. Toxic factors, problems and methods alleviating these in animals. International Workshop on the Utilization of Shrubs and Tree Fodders by Farm Animals. 24-29 July 1989 Denpasar, Bali. 20p.

- MARSHALL, D.R.; BROUE, P.; MUNDAY, J. 1979. Tannins in pasture legumes. *Aust. J. Agric. Anim. Husb.* 19:192-197.
- MARTIN-TANGUY, J.M; GUILLAUME, J.; KOSSA, A. 1977. Condensed tannins in horse bean seeds: chemical structure and apparent effects on poultry. *J.Sci.Fd.Agric.* 28:757-765.
- MAXSON, E.; ROONEY, L. 1972. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chem.* 49:719.
- MC LEOD, M.N. 1974. Plant tannins- their role in forage quality. *Nutr. Abs. Rev.* 44:803-815.
- MINSON, D.J.; HEGARTY, M.P. 1984. Toxic factors in tropical legumes. *IN Forage Legumes for Energy-Efficient Animal Production: Proceedings of a Trilateral Workshop held in Palmerston North, New Zeland.* Eds. R. Barnes; P.R. Ball; R.W. Broughman; G.C. Marten; D.J. Minson. USA Agricultural Research Service. p.246-250.
- MOLE, S.; WATERMAN, P.G. 1987. Tannins as antifeedants to mammalian herbivores- still an open question? *IN American Chemical Society.* Ed. G. Waller. Chapter 51.
- MUELLER-HARVEY, I.; REED J.D.; HARTLEY, R.D. 1987. Characterization of phenolic compounds, including flavonoids and tannins, of ten Ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. *J.Sci.Food Agric.* 39: 1-4
- PICHARD, G.R.; REATEGUI, K.; CAMPOS, R.E. 1989. Composición química y degradación ruminal de tejidos obtenidos de arbustos forrajeros presentes en la pradera natural mediterránea. s.l. p.19
- PORTER, L.J.; HRSTCH, L.N.; CHAN, B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins *Phytochem.* 25(1):223-230.
- PRESTON, T.R.; LENG, R.A. 1987. Matching ruminant production systems with available resources in the

- tropics and subtropics. Penambul Books, Armidale. 245p.
- PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J.Agric.Food Chem.* 26 (5):1214-1218.
- PRITCHARD, D.A.; STOCKS, D.C.; O'SULLIVAN, B.M.; MARTIN, P.R.; HARWOOD, I.S.; O'ROURKE, P.K. 1988. The effect of polyethylene glycol (PEG) on wool growth and liveweight of sheep consuming a mulga (*Acacia aneura*) diet. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 17:290-293.
- REED, J.D. 1986. Relationships among soluble phenolics, insoluble proanthocyanidins and fiber in east african browse species. *Journal of Range Management* 39:5-7.
- ; HORVATH, P.J.; ALLEN, M.S.; VAN SOEST, P.J. 1985. Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium. *J.Sci.Fd.Agric.* (36):255-261.
- ; MC DOWELL, R.E.; VAN SOEST, P.J.; HORVATH, P.J. 1982. Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage. *J.Sci.Fd.Agric.* 33:213-220.
- ; TEDLA, A.; KEBEDE, Y. 1987. Phenolics, fibre and fibre digestibility in the crop residue from bird resistant and non-bird resistant sorghum varieties. *J.Sci.Fd.Agric.* (39):113-121.
- REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; CORREA, J.B.C. 1981. Spectrophotometric determination of tannins by phosphotungstic-phosphomolibdic reagent. *Arq. Biol. Tecnol.* 24(4):407-411.
- RICKARD, J.E. 1986. Tannin levels in cassava, a comparison of methods of analysis. *J.Sci.Food Agric.* 37:37-42.
- ROBBINS, C.T.; HANLEY, T.A.; HAGERMAN, A.E.; HJELJORD, O.; BAKER, D.L.; SCHWARTZ, C.C.; MAUTZ, W.W.; 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. *Ecology.* 68(1):98-107.

- ROIG, C.A. 1989. Evaluación preliminar de 200 accesiones de leguminosas forrajeras tropicales en el ecosistema de bosque tropical lluvioso en Costa Rica (Guápiles, Costa Rica). Tesis Mag. Sci. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 179 p.
- ROJAS, O.; ELDIN, M.; LHOMME, J.P. 1977. Información del banco de datos agroclimáticos de Costa Rica. IICA-ORSTOM. San José, Costa Rica. V.2.
- ROUX, D.G. 1972. Recent advances in the chemistry and chemical utilization of the natural condensed tannins. Phytochem. 11:1220-1230.
- RUSSELL, R.W.; LOLLEY, J.R. 1989. Deactivation of tannin in high tannin milo by treatment with urea. J.Dairy Sci. 72 (9):2427-2430.
- SARKAR, S.K.; HORVATH, R.E.; GOPLEN, B.P. 1976. Condensed tannins in herbaceous legumes. Crop Science. 16:543-546.
- ; HOWARTH, R.E. 1976. Specificity of the vainilin tests for flavanols. J. Agric. Fd. Chem. 24:317.
- SAS INSTITUTE. 1982. SAS user's guide basics. Cary, North Carolina. 921p.
- SCHELIN, R.R. 1968. Drug metabolism by intestinal microorganisms. J.Pharmaceutical Sci. 57 (12):2021-2037.
- SEIKEL, M.K.; HILLIS, W.E. 1970. Hidrolisable tannins of *Eucalyptus delegatensis* wood. Phytochem. 9:1115-1128.
- STRUMEYER, D.H.; MALIN, M.J. 1975. Condensed tannins in grain sorghum: isolation, fractionation, and characterization. 23(5): 909-914.
- SWAIN, F.; HILLIS, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. J. Sc. Fd. Agric. 10:135-144.

- TAMIR, M.; ALUMOT, E. 1969. Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs. *J.Sci.Food Agric.* 20:199-202.
- THOMSON, D.J.; BEEVER, D.E.; HARRISON, D.G.; HILL, I.W.; OSBOURN, D.F. 1971. The digestion of dried lucerne (*Medicago sativa*) and dried sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) by sheep. *Proc. Nutr. Soc.* 30:14-15A.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society (G.B.)* 18:104.
- TORRES, J.H. 1986. *Plantas tánicas en Colombia.* Universidad Nacional de Colombia-Colciencias, Bogotá, Colombia. 176p.
- TUHAMI, M.K.; CUMMINS, D.G.; BURNS, R.E. 1980. Extractant color as a factor in grain sorghum analysis. *Agron. J.* 72:108-110.
- VAN SOEST, P.J. 1982. *Nutritional ecology of the ruminant.* O&B Books, Corvallis, Oregon. 374p.
- ; REED, D.J.; HORVATH, P.J. 1985. Tannins. *IN* Analysis of forages and fibrous foods: A laboratory manual for animal science. Eds. P.J. Van Soest; J.B. Robertson. Cornell University, Ithaca, New York. 165p.
- YAGUE, A. 1969. Los taninos vegetales. Ministerio de Agricultura, Madrid, España. pp.35-73.

APENDICE

A. ANALISIS DE TANINOS

A1. METODO DE FOLIN-DENIS

REACTIVOS

- 1.- Solución Saturada de Carbonato de Sodio: A cada 100 ml H_2O añadir 35 g Na_2CO_3 anhidro, disolver a 70-80 °C y dejar enfriar
- 2.- Solución Estandar de Acido Tánico: Disolver 100 mg de ácido tánico en 1 L H_2O . Disolver 10 ml de la solución en un balón de 100 cc con H_2O destilada. Preparar la solución para cada determinación (equivale a 10 ppm, cuando no se considera la última dilución).
- 3.- Reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles (Sigma).

PROCEDIMIENTO

- 1.- Pesar 100 mg de muestra y agregar en un balón.
- 2.- Añadir 75 ml de H_2O .
- 3.- Refluir por 5 horas.
- 4.- Enfriar a temperatura ambiente.
- 5.- Filtrar muestra en un balón de 100 cc. Aforar.
- 6.- Mezclar bien y dejar en reposo.
- 7.- Tomar 2 alícuotas de 5 ml y ponerlas en dos tubos (A y B: blanco para corregir).
- 8.- Agregar 0,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu al tubo A.

- 9.- Agregar 1 ml de carbonato de sodio (en ambos tubos).
- 10.- Completar a volumen de 10 ml.
- 11.- Leer 40 minutos después de adicionar el carbonato, a 650 nm.
- 12.- Hacer blanco de reactivos para calibrar el cero.

CALCULOS

$$\% \text{ Taninos como ácido tánico} = \frac{(\text{Conc. A} - \text{Conc. B})}{(\text{Muestra} * \text{MS}) * 100}$$

donde:

Conc.A= concentración de muestra, ppm.

Conc.B= concentración del blanco, ppm.

Muestra= peso de la muestra en gramos.

MS= materia seca de la muestra a 110°C.

A2. METODO DE N-BUTANOL

REACTIVOS

- 1.- Butanol al 95%: Medir 5ml de HCl concentrado y llevarlo a 100 ml con n-butanol.
- 2.- Butanol (n-butanol 100%).

PROCEDIMIENTO

- 1.- Pesar una muestra de 0.02 gr molida en malla de 1 mm.
- 2.- Poner la muestra en un tubo de 10 ml con tapa y agregar 6 ml de solución de butanol al 95%, a temperatura ambiente.
- 3.- Calentar en baño de agua durante dos horas, a 95 °C (temperatura constante).
- 4.- Agitar cada 10 minutos.
- 5.- Realizar los pasos 1 al 4 para el blanco (utilizar n-butanol 100% en lugar de soln. 95%).
- 6.- Enfriar.
- 7.- Leer en un espectrofotómetro a 550 nm.

CALCULOS

Taninos como $\text{Abs}_{550}/\text{gr M.} = \frac{\text{Abs.A} - \text{Abs.B}}{\text{Muestra} * \text{MS.}}$

donde:

$\text{Abs}_{550}/\text{gr M.}$ = concentración de proantocianidinas en términos de absorbancia (a 550 nm) por gramo de muestra.

Abs.A= absorbancia de muestra.

Abs.B= absorbancia del blanco.

Muestra= peso de la muestra en gramos.

MS= materia seca de la muestra a 110°C.

A3. METODO GRAVIMETRICO DE ITERBIO

REACTIVOS

- 1.- Solución de acetona al 70% en agua (soln. acetona):
mezclar 700 ml acetona con 300 ml de H₂O.
- 2.- Acetato de iterbio 0.1 M: disolver 4.22 g de acetato de iterbio tetrahidrato (3.689 de monohidrato de iterbio) en agua destilada. Añadir 3 gotas de ácido acético glacial, y llevar a 100 ml en frasco volumétrico.
- 3.- Trietanolamina 0.1 M: disolver 1.49 g de trietanolamina en 100 ml del reactivo de acetona al 70%.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Secar material y moler a 1mm.
- 2.- Pesar 0.1 g y colocar en tubo de ensayo de 6ml.
- 3.- Extraer con solución de acetona, de la siguiente forma:
añadir 4 ml de soln. acetona al tubo con la muestra, agitar en un vortex y dejar reposar por un minuto. Repetir dos veces más. Luego centrifugar por 2 min. a 1000 rpm. Para la extracción se utiliza un "gotero" con un pedacito de algodón adentro (a modo de filtro).

- 4.- Repetir el punto 3, tres veces más. En total deberán hacerse 4 extracciones de 4 ml con soln. acetona, cada vez.
- 5.- Los extractos se colocan en un erlenmeyer de 50 ml.
- 6.- Añadir 2 ml de soln. Iterbio 0.1 M al extracto.
- 7.- Agregar 15 ml de soln, trietanolamina.
- 8.- Sellar el erlenmeyer y refrigerar por 24 h.
- 9.-Pesar un papel de filtro de 9 cm (Whatman nº40)
- 10.- Filtrar al vacío.
- 11.- Enjuagar el precipitado con agua destilada y soln acetona (50 ml). Se puede usar más soln. acetona hasta que salga claro.
- 12.- Secar el papel de filtro más el precipitado por 3 horas y pesar.
- 13.- Por diferencia se calcula como porcentaje del peso seco de la muestra.

CALCULOS

$$\% \text{ Taninos solubles totales} = \frac{((\text{Pptado} + F) - (F * \text{MSF})) * 100}{(\text{Muestra} * \text{MS})}$$

donde:

Pptado+F= peso del papel de filtro con el precipitado de iterbio, en gramos.

F= peso del papel de filtro

MSF= materia seca del filtro, en gramos

Muestra= peso de la muestra, en gramos.

MS= materia seca de la muestra, en gramos.

A4. METODO DE VANILINA

REACTIVOS

- 1.- HCl 8% en Metanol: medir 4 ml de HCl conc., llevarlo a 50 ml con metanol (preparar diariamente).
- 2.- Vainillina 1%: Pesar 0.5 gr de Vainillina, llevarlo a 50 ml con metanol (preparar diariamente).
- 3.- Vanilina-HCl 0.5%: Mezclar las soluciones 2 y 3.
- 4.- HCl 4% en Metanol: Medir 2 ml de HCl conc., llevarlo a 50 ml con metanol.
- 5.- Estandar de Catequina: Pesar 75 mgr de catequina, llevarla a 25 ml de metanol (ppm= mg/L entonces equivale a 3000 ppm).

PROCEDIMIENTO

- 1.- Pesar una muestra de 0.30 gr molida en malla de 1 mm.
- 2.- Poner la muestra en un tubo de 10 ml con tapa y agregar 6 ml de metanol, a temperatura ambiente.
- 3.- Agitar el tubo por 45 minutos en un agitador mecánico .

- 4.- Centrifugar el tubo por 3 minutos a 2000 rpm.
- 5.- Del sobrenadante tome 2 alicuotas de 2 ml y póngalas en dos tubos (A y B, blanco para corregir).
- 6.- Agregar 10 ml del reactivo de vanilina-HCl al tubo A. Agitar y dejar reposar.
- 7.- Al tubo B, agregar 10 ml del reactivo HCl al 4% en metanol. Agitar y dejar reposar.
- 8.- Después de 20 minutos leer en un espectrofotómetro a 500 nm.
- 9.- Usar un blanco para calibrar el 100% con 5 ml de la mezcla de vanilina-HCl y 1 ml de metanol.

CALCULOS

$$\% \text{ Taninos como catequina} = \frac{(\text{Conc. A} - \text{Conc. B}) * 600}{(\text{Muestra} * \text{MS}) * 10^6}$$

donde:

Conc.A= concentración de muestra, ppm.

Conc.B= concentración del blanco, ppm.

Muestra= peso de la muestra en gramos.

MS= materia seca de la muestra a 110°C.