

Efecto del manejo poscosecha del forraje y la adición de polietilen glicol en la concentración y la astringencia de taninos condensados en leguminosas tropicales

R. Barahona*, C. E. Lascano**, R. Cochran* y J. Morrill*

Introducción

El valor forrajero de algunas leguminosa tropicales seleccionadas por su buen comportamiento agronómico en suelos ácidos, podría ser limitado por niveles altos de taninos condensados (Cano et al., 1994; Carulla, 1994; Perdomo, 1991). Investigación realizada con leguminosas de zonas templadas y, en menor grado, con leguminosas tropicales, sugiere que los taninos condensados (TC) podrían ejercer efectos benéficos o nocivos en animales rumiantes, dependiendo de la cantidad presente en el forraje comestible. Niveles altos de TC inhiben el consumo, así como la digestión de la fibra y la proteína, lo que resulta en pobre producción de animales (Barry, 1985; Barry y Duncan, 1984; Carulla, 1994). Por otra parte, concentraciones bajas de TC en leguminosas de zonas templadas y tropicales se han relacionado con una mejor utilización de nitrógeno (N) en ovinos (Carulla, 1994; Waghorn et al., 1987). Estos resultados son una buena justificación para seleccionar especies y ecotipos de leguminosas forrajeras herbáceas y arbustivas con bajos niveles de TC.

Para implementar un esquema efectivo de selección de plantas con bajo contenido de TC es necesario definir mejor cómo los diferentes niveles de estos compuestos afectan a los rumiantes. Un enfoque experimental es reducirlos con polietilen glicol (PEG). En varios estudios se ha utilizado PEG para medir el

efecto de los TC en el consumo, la digestión y la utilización de N por rumiantes alimentados con leguminosas de zonas templadas y tropicales (Barry y Duncan, 1984; Barry et al., 1986; Bhatia et al., 1987; Carulla, 1994; Pritchard et al., 1988). El principio del funcionamiento del PEG se basa en su unión con los TC en preferencia a proteína (Jones y Mangan, 1977). Además, la concentración de TC en las leguminosas puede ser afectada mediante tratamientos poscosecha o preparación del forraje. Terrill et al. (1989) encontraron que muestras de cultivares de *Sericea lespedeza* secadas en el campo contenían menos TC comparadas con muestras frescas congeladas. En forma similar, Cano et al. (1994) encontraron que muestras de varias leguminosas tropicales secadas en horno (60 °C) contenían menos TC extractables que aquellas liofilizadas.

Para realizar ensayos con animales alimentados con leguminosas altas en TC es necesario definir el efecto del PEG en el nivel de TC extractables en leguminosas tropicales sometidas a diferentes métodos de conservación poscosecha. Por lo tanto, en el Laboratorio de Calidad de Forrajes del CIAT se realizó un estudio para determinar los efectos del nivel de PEG y el método de conservación en el nivel y la astringencia —capacidad de los TC extractables para unirse a proteína— de los TC en leguminosas tropicales.

Materiales y métodos

Forrajes. Se utilizaron una leguminosa herbácea (*Desmodium ovalifolium*) y una arbustiva (*Flemingia macrophylla*) cultivadas en suelos ácidos de Quilichao (3° 6' N, 76° 31' O), Cauca, Colombia. Se cosechó manualmente el forraje de una parcela pura de *D. ovalifolium* y se tomó una muestra fresca que se tamizó para separar las hojas y los tallos finos de los tallos

* Respectivamente: Estudiante graduado e investigadores del Departamento de Ciencias Animales e Industria, Universidad Estatal de Kansas, Manhattan, KS 66506, E.U.

** Jefe de Calidad de Pasturas del Programa de Forrajes Tropicales del CIAT, Apdo. Aéreo 6713, Cali, Colombia.

largos y maduros. Submuestras de hojas y tallos finos se sometieron a los tratamientos poscosecha siguientes: (1) T1 = Forraje fresco + PEG y congelamiento posterior. (2) T2 = Forraje fresco + PEG y secado al sol. (3) T3 = Forraje secado al sol + PEG. Se utilizaron cinco concentraciones de PEG-MW 8000: 0, 15, 25, 35 y 45 g/kg de MS en cada tratamiento de *D. ovalifolium*.

El forraje de *F. macrophylla* se cosechó a mano y se separaron las hojas de los tallos. Varias submuestras de hojas frescas de esta leguminosa se secaron al sol y se sometieron a los mismos niveles de PEG utilizados con *D. ovalifolium*. En ambas leguminosas se aplicó una solución de PEG en agua destilada, de tal forma que todas las muestras recibieron 20 ml/100 g de MS del forraje. Las muestras que no recibieron PEG se rociaron con una cantidad equivalente de agua destilada.

Procedimientos en laboratorio. Las muestras congeladas de *D. ovalifolium* (T1) con y sin PEG, se maceraron en presencia de N líquido antes del análisis de taninos. Las muestras secadas al sol se molieron en un tamiz de malla de 1 mm. En todos los casos se revisaron cuidadosamente las muestras para eliminar los tallos grandes que podrían alterar el análisis de taninos.

Las muestras de forraje se analizaron por TC extractables y ligados a proteína y ligados a fibra, utilizando el método butanol-HCl de Terrill et al. (1992), modificado por Carulla (1994). Para extraer los taninos se utilizó una solución acuosa de 70% metanol, 0.5% ácido fórmico, y 0.05% ácido ascórbico, en lugar de acetona acuosa al 80% que se utilizó en el método original. Además, el éter dietílico se eliminó del solvente orgánico debido a la recuperación incompleta de taninos que ocurrió cuando este reactivo se utilizó (Carulla, 1994). De cada leguminosa se extrajeron taninos, utilizando el procedimiento propuesto por Asquith y Butler (1985) para taninos de "quebracho", con las modificaciones propuestas por Hagerman (no publicado). Estos taninos purificados se utilizaron como estándares para la determinación colorimétrica de las fracciones de tanino, con un espectrofotómetro calibrado a una longitud de onda de 550 nm.

La astringencia de los TC extractables, medida como la capacidad de los taninos para precipitar albúmina sérica bovina (ASB), fue determinada mediante el ensayo de difusión radial de Hagerman (1987), modificado por Lareo et al. (1990). Para este ensayo, 100 mg de muestra molida se sometieron a extracción con 1 ml del metanol acuoso de 70% anteriormente mencionado y el extracto resultante se

utilizó en la prueba de difusión radial. La concentración de TC extractables en las muestras se determinó utilizando el método butanol-HCl.

Análisis de resultados

Los resultados obtenidos con *D. ovalifolium* se analizaron como un factorial 3 x 5, donde los métodos de manejo de conservación poscosecha y los niveles de PEG fueron los factores principales. El análisis de varianza se hizo por SAS y los promedios se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (DMS). Los resultados de concentración de fracciones de TC y astringencia de taninos en *D. ovalifolium* y *F. macrophylla* secados al sol se analizaron utilizando la especie de leguminosa (2) y los niveles de PEG (5) como factores principales.

Mediante análisis de regresión se establecieron las relaciones entre diferentes fracciones de TC (Y) y astringencia (Y) con el nivel de PEG (x) para cada especie de leguminosa y método de conservación.

Resultados y discusión

Concentración de taninos. El mayor efecto de los tratamientos poscosecha del forraje y de los niveles de PEG adicionados ocurrió en la fracción de taninos extractables; por lo tanto, no se presentan los resultados con los taninos ligados. Los TC extractables fueron más altos ($P < 0.05$) en las muestras secadas al sol (T2 = 120 y T3 = 117 g/kg de MS) que en muestras frescas-congeladas (T1 = 84 g/kg de MS). La concentración de TC extractables en *D. ovalifolium* se redujo exponencialmente con el aumento del nivel de PEG, independientemente del método de conservación de forraje (Figura 1). El modelo exponencial utilizado ($Y = A + Be^{-kx}$) indicó que a partir de un punto (40 a 60 g/kg de MS) las cantidades adicionales de PEG aplicadas al forraje no produjeron cambios apreciables en la cantidad de TC extractables. Cano et al. (1994) también observaron la reducción de TC extractables en leguminosas tropicales que fueron congeladas y maceradas en un medio de N líquido. Es posible que la maceración destruya las vacúolas de las células y, como una consecuencia, los TC extractables son liberados y reaccionan con la proteína en el citoplasma.

En todas las concentraciones de PEG se encontró que el promedio de los TC extractables en *F. macrophylla* fue inferior ($P < 0.05$) al de *D. ovalifolium* (97 vs. 117 g/kg de MS) (Figura 2), sometidas al mismo proceso de secado. El aumento en el nivel de PEG ocasionó una disminución exponencial en los TC extractables de *F. macrophylla* secada al sol, tal como se observó en *D. ovalifolium*, alcanzándose un punto

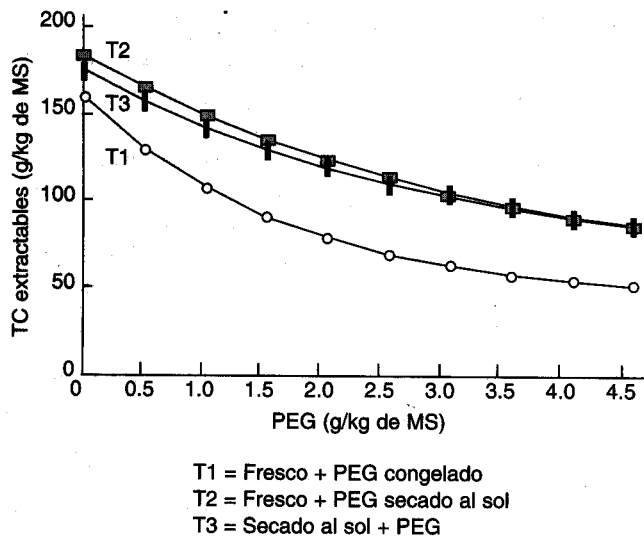


Figura 1. Efecto del polietilén glicol (PEG) en los taninos de *Desmodium ovalifolium* sometido a diferentes tratamientos poscosecha.

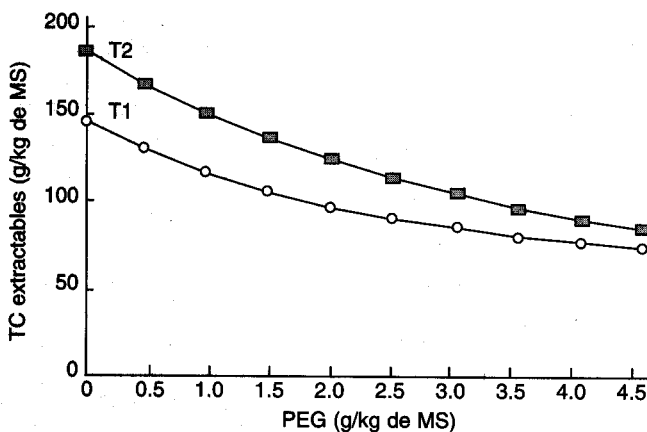


Figura 2. Efecto del polietilén glicol (PEG) en los taninos extractables de *Flemingia macrophylla* (T1) y *Desmodium ovalifolium* (T2) secados al sol.

(60 g/kg de MS) donde estos permanecieron relativamente estables al aumentar los niveles de PEG (Figura 2).

Los resultados de este estudio indican que los TC extractables en las leguminosas fueron afectados por PEG, independientemente que éste se aplique antes o después del secado al sol. La reducción de los TC extractables al aumentar los niveles de PEG fue de tipo exponencial, pero se alcanzó un punto asíntotico donde la concentración de TC extractables permaneció relativamente constante al aumentar el nivel de PEG. Esto sugiere que las leguminosas evaluadas tienen una fracción de TC extractables que no es reactiva con PEG y posiblemente con proteínas.

Astringencia de taninos. Se reconoce que los taninos tienen gran afinidad por las proteínas, o sea, astringencia. También se sabe que los complejos taninos-proteína pueden ser reversibles, o irreversibles (Fahey y Jung, 1989). Los compuestos reversibles de taninos-proteína parecen ser insolubles entre pH 3 y 7, pero se disocian a pH inferior a 3 o mayor que 8 (Jones y Mangan, 1977).

Existen varios métodos para medir la cantidad de proteína ligada por los taninos de una planta (Asquith y Butler, 1985; Bate-Smith, 1973; Hagerman y Robbins, 1987; Martin y Martin, 1982). Uno de ellos, conocido como difusión radial (Hagerman, 1987), se basa en la unión de taninos con proteína en un gel (pH 5) y en la formación de un precipitado en forma de anillo. El diámetro del anillo es proporcional al nivel de TC extractables en la planta (Lareo et al., 1990). En este estudio se utilizó este método para evaluar cómo la conservación de forraje y el nivel de PEG podrían afectar la astringencia de TC en leguminosas tropicales. Los resultados (Figura 3) indicaron que el promedio de astringencia (g de proteína precipitada/g de TC

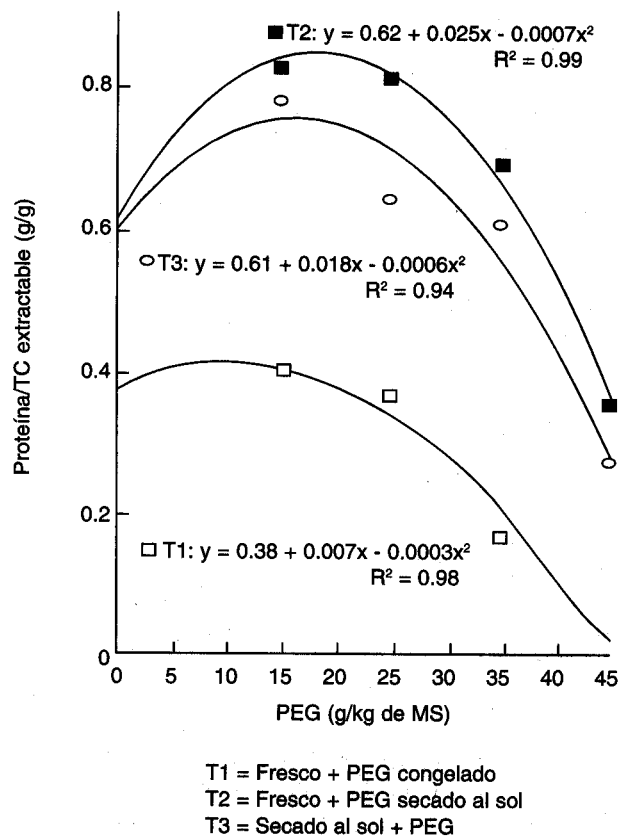


Figura 3. Efecto del polietilén glicol (PEG) en la proteína ligada por TC extractables de *Desmodium ovalifolium* sometido a diferentes tratamientos de preservación.

extractable) fue inferior ($P < 0.05$) en muestras frescas-congeladas (0.3) de *D. ovalifolium* comparado con muestras secadas al sol (entre 0.6 y 0.7).

En la misma Figura 3 se observa que existió una relación cuadrática entre la astringencia de TC extractables y el nivel de PEG en todos los tratamientos. En la concentración más alta de PEG (45 g/kg de MS) agregada a muestras frescas congeladas (T1), los TC extractables fueron totalmente ligados a PEG, como lo indica la ocurrencia de una precipitación mínima de proteína. En contraste, con el nivel más alto de PEG que se aplicó a las muestras secadas al sol (T2 y T3), aún parece que existía TC extractables capaces de reaccionar con proteína. Por lo tanto, se observó una interacción ($P < 0.05$) entre el método de conservación de forraje y el nivel de PEG. Estas diferencias no eran esperadas y podrían estar relacionadas con cambios en polimerización de los TC inducidos por el calor (Cano et al., 1994).

El promedio de la astringencia (0.6) fue ligeramente mayor ($P < 0.05$) con los TC extractables en muestras de *D. ovalifolium* secadas al sol, comparado con muestras de *F. macrophylla* (0.5) que recibieron un tratamiento igual. Las diferencias en la astringencia de los TC entre especies de leguminosas podrían estar relacionadas con el peso molecular de los taninos, como se discutirá más adelante. Se observó igualmente una relación cuadrática entre el nivel de PEG y la astringencia de los TC extractables en las dos leguminosas secadas al sol (Figura 3); sin embargo, en este caso, las diferencias entre especies en la astringencia de los taninos se redujeron al aumentar el nivel de PEG, indicando una interacción ($P < 0.05$) entre especie de leguminosa y nivel de PEG.

El buen ajuste de un modelo exponencial y otro cuadrático para la concentración de TC extractables y astringencia, respectivamente, en función de la concentración de PEG, sugiere que existen, por lo menos, tres tipos de TC extractables en las leguminosas evaluadas. En primer lugar se deduce que existen dos fracciones de TC con diferente capacidad para reaccionar con PEG y proteína y una tercera fracción no reactiva con PEG y proteína. A bajos niveles de PEG, la fracción de TC extractables menos reactiva parece haber sido preferentemente ligada por PEG pero, en la medida en que aumentó el nivel de PEG, los TC extractables más reactivos fueron ligados. Lo anterior concuerda con los resultados de cromatografía de capa fina, que mostraron por lo menos dos manchas diferenciadas de proantocyanidinas en los TC extractables purificados de *D. ovalifolium* (Cano, R., información no publicada).

Las diferencias en reactividad de los TC extractables en las leguminosas evaluadas podrían estar asociadas con sus pesos moleculares. Existen estudios que muestran que el grado de polimerización o peso molecular (PM) de los TC puede afectar la formación de complejos de tanino-proteína. Según Salunkhe et al. (1990), el PM de los taninos puede variar entre 500 y 3000, y los compuestos fenólicos de bajo PM forman enlaces cruzados con proteínas, mientras que aquellos con alto PM parecen ser ineficientes como agentes de taninos. Oh y Hoff (1979) observaron que la astringencia de los taninos de uva aumentó desde un mínimo cuando el PM era de 500 hasta un máximo cuando era 2100, y luego descendió a medida que éste fue mayor. Por otra parte, Jones et al. (1976) encontraron que los taninos de mayor PM en *O. vicifolia* fueron menos astringentes que los taninos de más bajo PM en *Lotus* spp.

Los resultados obtenidos en el Laboratorio de Calidad del Programa de Forrajes Tropicales del CIAT sugieren la existencia de TC extractables de diferente PM dentro y entre especies de leguminosas tropicales. Las estimaciones de PM equivalentes utilizando como referencia la catequina (un monómero) mostraron rangos desde 580 para *Tadehagi* spp. hasta 1450 para *D. ovalifolium*. Otras especies como *Dioclea guianensis* y *F. macrophylla* presentaron taninos con PM equivalente entre 580 y 870, respectivamente. Los TC extractables con más bajo PM equivalente parecen ser menos reactivos con proteína (BSA) que aquellos con mayor PM (Lascano, C.E. y Carulla, J., información no publicada). Por tanto, en los estudios futuros se debe definir la estructura de los taninos presentes en las leguminosas forrajeras tropicales.

Conclusiones

Los resultados de este estudio muestran que la astringencia de los taninos de *D. ovalifolium* fue afectada por el método de conservación y el nivel de PEG. El método de conservación que no utilizó calor (fresco-congelado) dio lugar a TC extractables que reaccionaron menos con proteína que aquellos en los cuales las muestras se expusieron al calor (secado al sol), lo cual probablemente está relacionado con la polimerización de los TC extractables. Por otra parte, los TC extractables en *F. macrophylla* fueron menos reactivos con proteína que los TC extractables de *D. ovalifolium*, lo que probablemente está relacionado con diferencias en el PM de los taninos presentes en ambas leguminosas. Todavía más interesante fue la relación cuadrática observada entre astringencia de los TC extractables y el nivel de PEG, independientemente del método de manejo poscosecha del forraje o de la especie de leguminosa.

Esta relación sugiere que por lo menos dos grupos de taninos con diferentes PM y afinidad por proteína están presentes en las leguminosas evaluadas. Parece que un tercer grupo de TC extractables que aparentemente no reacciona con PEG y proteína también está presente en estas leguminosas.

Implicaciones de los resultados

Los resultados del estudio indican que el PEG agregado al forraje de leguminosas reduce los TC extractables en forraje fresco-congelado o secado al sol, independientemente si aquel se agregó antes o después de secar el forraje. Los resultados mostraron que la reducción de los TC extractables con PEG fue exponencial y no lineal y que cierta proporción de los TC no reaccionó con proteína. Esto implica que hay necesidad de cuantificar la relación entre TC extractables y el nivel de PEG en leguminosas forrajeras, antes de su uso en ensayos de alimentación. Además, el método de conservación de forraje podría afectar potencialmente la actividad de TC extractables presentes en una especie determinada de leguminosa. Esto implica que al seleccionar leguminosas con taninos existe la necesidad de evaluar, no sólo la concentración de taninos en el forraje, sino también la estructura o tipo de TC extractables presentes en el forraje manejado en forma similar a como se alimentan a los animales.

Summary

A study was conducted to determine the effects of polyethylene glycol (PEG) and sample preservation method on concentration and astringency (i.e. capacity of tannins to bind protein) of condensed tannins (CT) in tropical legumes. Leaves from *Desmodium ovalifolium* were subjected to three treatments: T1: fresh forage + PEG, samples frozen; T2: fresh forage + PEG, samples sun-dried, and T3: sun-dried forage + PEG. Five concentrations (0, 15, 25, 35, and 45 g/kg of DM) of PEG (MW 8000) were included in each treatment. Sun-dried leaves of *Flemingia macrophylla* were also subjected to the same five levels of PEG used with *D. ovalifolium*. Samples from the different treatments and legume species were analyzed for extractable and bound CT with a modified butanol-HCl procedure and for astringency using the radial diffusion assay and bovine serum albumine as the protein source. Extractable CT were affected ($P < 0.05$) by PEG, but both forage preservation method and legume species x PEG interactions ($P > 0.05$) were observed. Increasing the concentration of PEG resulted in an exponential decline of extractable CT, but a point was reached (42 to 61 g/kg DM) where further increments of PEG resulted in only small changes in extractable CT. This

suggested the presence of extractable CT that were non-reactive with PEG in the legumes tested. Extractable CT from sun-dried *D. ovalifolium* were more astringent than those from sun-dried *F. macrophylla*. However, astringency of CT from *D. ovalifolium* was lower ($P < 0.05$) in frozen samples as compared with sun-dried samples, regardless of PEG concentration. A quadratic relationship was observed between astringency of CT and PEG concentration, which suggested that CT with different affinity for protein were present in the legumes evaluated. Results indicate that PEG is useful for reducing extractable CT in fresh or dried forage. However, the effect of PEG on extractable CT and astringency should be established for each legume species prior to their use in feeding experiments.

Referencias

- Asquith, T. N. y Butler, C. L. 1985. Use of dye-labelled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *J. Chem. Ecol.* 11:1535-1544.
- Barry, T. N. 1985. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 3: Rates of body and wool growth. *Br. J. Nutr.* 54:211-217.
- _____ y Duncan, S. J. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 1: Voluntary intake. *Br. J. Nutr.* 51:485-491.
- _____; Manley, T. R.; y Duncan, S. J. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4: Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Br. J. Nutr.* 55:123-137.
- Bate-Smith, E. C. 1973. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemical* 12:907-912.
- Bhatia, D. R.; Kumar, R.; y Patnayak, B. C. 1987. Annual Report Central Sheep and Wool Research Institute. India. Avikanagar-304501. p. 30.
- Cano, R., J.; Carulla E.; y Lascano, C. E. 1994. Metodos de conservación de muestras de forraje de leguminosas tropicales y su efecto en el nivel y la actividad biológica de los taninos. *Pasturas Trop.* 16(1):2-7.
- Carulla, J. E. 1994. Forage intake and N utilization by sheep as affected by condensed tannins. Tesis PhD. University of Nebraska, Lincoln, E.U.
- Fahey, Jr. G. C. y Jung, H. G. 1989. Phenolic compounds in forages and fibrous feedstuffs. En: Cheeke, P.R. (ed.). *Toxicants of plant origin.* CRC Press, Inc. Boca Raton, E.U. v. 4, p. 123.
- Hagerman, A. E. 1987. Radial diffusion method for determining tannin plant extracts. *J. Chem. Ecol.* 13:437-449.

- _____ y Robbins, C. T. 1987. Implications of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *J. Chem. Ecol.* 13:1243-1259.
- Jones, W. T.; Broadhurst, R. B.; y Lyttleton, J. W. 1976. The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochemical* 15:1407-1409.
- _____ y 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. Food Agric.* 28:126-136.
- Lareo, L. R.; Barona, E.; y Sarria, A. 1990. Radial diffusion as a screening method for tannin-protein binding capacity in foods and feeds. Proceedings. XVth International Conference of the Group Polyphenols. JIEP'90. July 9-11. University Louis Pasteur, Strasbourg, Francia. p. 248-252.
- Martin, J. S. y Martin, M. M. 1982. Tannin assays in ecological studies: Lack of correlation between phenolics, proanthocyanidins, and protein-precipitating constituents in mature foliage in six oak species. *Oecologia* 54:205-211.
- Oh, H. I. y Hoff, J. E. 1979. Fractionation of grape tannins by affinity chromatography and partial characterization of the fractions. *J. Food Sci.* 44:87-89.
- Perdomo, P. 1991. Adaptación edáfica y valor nutritivo de 25 especies y accesiones de leguminosas arbóreas y arbustivas en dos suelos contrastantes. Trabajo dirigido de grado en zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira.
- Pritchard, D. A.; Stocks, D. C.; O'Sullivan, B. M.; Martin, P. R.; Hurwood, I. S.; y 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.
- Salunkhe, D. K.; Chavan, J. K.; y Kadam, S. S. 1990. Dietary tannins: Consequences and remedies. CRC Press, Inc. Boca Raton, E.U.
- SAS. 1990. SAS/STAT User's Guide (4th ed.). SAS Inst., Inc., Cary, NC, E.U.
- Terrill, T. H.; Rowan, A. M.; Douglas, G. B.; y Barry, T. N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentration in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58:321-329.
- _____; Windham, W. R.; Hoveland, C. S.; y Amos, H. E. 1989. Forage preservation method influences on tannin concentration, intake and digestibility of *Sericea lespedeza* by sheep. *Agron. J.* 81:435-439.
- Waghorn, G. C.; John, A.; Jones, W. T.; y Shelton, I. D. 1987. Nutritive value of *Lotus corniculatus* L. containing low and medium concentrations of condensed tannins for sheep. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 47:25-30.