

2ej. 48

**Universidad Nacional Autónoma
de México**



FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES TECNICAS PARA LA
DETERMINACION DE TANINOS Y DE DOS METODOS
VIABLES PARA SU ELIMINACION EN SORGO (SORGHUM
BICOLOR).**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo**

p r e s e n t a

GONZALEZ PEREZ MARIA LETICIA



México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

A.- INTRODUCCION.....	1
B.- OBJETIVOS GENERALES.....	2
C.- GENERALIDADES.....	3
1.- Descripción Botánica.....	4
2.- Taninos.....	8
- Clasificación.....	9
3.- Propiedades Fisicoquímicas de los taninos.....	12
4.- Interacción con proteínas.....	12
5.- Aspectos nutritivos del sorgo relacionados con los taninos.....	14
6.- Energía metabolizable del sorgo.....	22
D.- METODOS ANALITICOS.....	24
1.- Métodos analíticos para taninos.....	25
2.- Material y métodos.....	34
3.- Método Lowenthal (oxidación con $KMnO_4$).....	35
4.- Método del Sulfato Férrico Amoniacal (FAS).....	38
5.- Método Folin-Denis.....	41
6.- Técnica del % de recuperación anítica.....	44
7.- Eliminación de Taninos.....	45
8.- Análisis Químico Proximal.....	47

E.- RESULTADOS

1.- Contenido de Taninos en sorgo aplicando 3 métodos analíticos.....	52
2.- Análisis estadístico entre los métodos analíticos aplicados.....	53
3.- Contenido de Taninos en sorgo después del tratamiento térmico.....	55
4.- Análisis estadístico de los resultados del tratamiento térmico.....	56
5.- Contenido de Taninos en sorgo después del tratamiento térmico.....	57
6.- Análisis estadísticos de los resultados del tratamiento alcalino.....	58
7.- Resultados del estudio químico pro- ximal antes y después de los tratamientos.....	60

F.- DISCUSION DE RESULTADOS.....	63
----------------------------------	----

G.- CONCLUSIONES.....	67
-----------------------	----

H.- BIBLIOGRAFIA.....	69
-----------------------	----

I N T R O D U C C I O N
= = = = =

La industria pecuaria basa su crecimiento en un adecuado y oportuno suministro de insumos para la elaboración de los -- distintos alimentos de las especies animales en explotación.

Se sabe que el sorgo, como ingrediente en los alimentos - es la base como principal contribuyente de energía por su alto contenido de carbohidratos. Este cereal, comparativamente con el resto de las gramíneas tiene la particularidad de crecer y dar altos rendimientos en climas semi-áridos, lo cual favorece desde todos los puntos de vista su explotación en el medio agrí cola mexicano. De ésto hablan claramente las crecientes esta - dísticas de producción y consumo. Sin embargo, dentro de las - peculiaridades de éste grano, se muestra que contiene una va - riada cantidad de taninos, sustancias ampliamente conocidas -- por sus efectividad en la industria de la curtiduría, por su - capacidad para producir astringencia y por su cualidad antinu - tricional al ligar diferentes proteínas y hacerlas no disponi - bles. Curiosamente, la variedad que más rendimiento produce, - es la que más adaptabilidad posee a nuestro clima y por ende - la más explotada. Sin embargo, es la que mayor cantidad de ta - ninos presenta en su composición. Por lo anterior, y con fines netamente de coadyuvar a un mejor aprovechamiento de éste insu - mo en la industria pecuaria, ésta investigación se ha fijado - los siguientes objetivos.

O B J E T I V O S G E N E R A L E S

= = = = =

- A). Seleccionar una técnica Analítica precisa y confiable para la detección rutinaria de taninos.
- B). Encontrar un método para eliminar los taninos de Sorgos -- con alto contenido de ellos para su posible aplicación comercial.
- C). Determinar el grado de afectación en la composición Bromatológica del Sorgo al eliminar los taninos.

GENERALIDADES

El Sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) es uno de los principales cereales producidos en el mundo, originario de África y Asia, fué introducido al continente Americano hace unos 200 años. Actualmente más del 50% de la producción mundial corresponde a América. En México, el sorgo ocupa el tercer lugar en lo referente al área cosechada y el quinto lugar entre los -- principales países productores del mundo, después de los Estados Unidos de Norte América, China, India y Nigeria. (4)

El sorgo es un grano muy importante para el consumo humano en algunas partes de Asia y África, además, de que se ha estimado por la Agencia para el Desarrollo Internacional (AID) -- que más de 300 millones de personas dependen del sorgo como su principal alimento. (23)

En México el cultivo del sorgo ha alcanzado un notable desarrollo en los últimos años. Este impulso es debido sin duda, a la demanda que este grano tiene para consumo animal, dicho -- impulso en la producción nacional ha sido posible gracias a -- que este cereal es productivo en aquellas regiones donde la sequía origina pérdidas o bajos rendimientos de otros cultivos, lo cual lo coloca en una situación más ventajosa frente a -- otros cereales. (4,18)

La industria nacional de los alimentos balanceados para -- consumo animal, depende básicamente del grano del sorgo como -- fuente de energía para la fabricación de alimentos ya que -- otros cereales como el maíz y el trigo son destinados al consumo casi exclusivo del hombre. Aunque en México el sorgo no es consumido directamente por el humano, en forma indirecta el mexicano lo consume a través de alimentos de alto valor nutritivo como son la carne de pollo, carne de cerdo y huevo principalmente. (19)

Químicamente, el grano de sorgo es similar al del maíz. -- En promedio tiene cerca de 2% más de proteína y 1% menos de --

grasa, mientras que el contenido de aminoácidos del grano de - sorgo es, aproximadamente el mismo que el del maíz. Por otra parte, el grano del sorgo es particularmente deficiente en Lisina. Las grasas en el grano de sorgo y en el de maíz son casi idénticas en su composición, así como los minerales, los -- cuales sólo difieren ligeramente. (23).

DESCRIPCION BOTANICA.

Los diferentes tipos de sorgo fueron clasificados por Lino en el año de 1753 en el género Holcus. Moench en 1794 le a signó el nombre genérico de Sorghum y es como se conoce actual mente. (4,9)

De acuerdo a los grados y reglamentaciones de los Estados Unidos de Norteamérica, existen cuatros clases de sorgo:

- 1.- Yellow. (amarillo) .- Sorgo de poco o ningún contenido de taninos (ácido tánico). El color de la semilla puede ser blanca, amarilla o roja, y todavía sigue -- siendo Yellow si contiene menos del 10% de granos con alto contenido de taninos.
- 2.- Brown. (café) .- Sorgo con alto contenido de taninos; el valor nutritivo puede ser reducido hasta un 30% de bido a la presencia de taninos.
- 3.- Mixed Sorghum (sorgo mezclado) . Este grado es la combinación de amarillo y café, cuando más del 10% de -- los granos son de sorgo café.
- 4.- White Sorghum (sorgo blanco) .- Este es el blanco puro - El sorgo blanco no está disponible en la actuali dad en el mercado. (5)

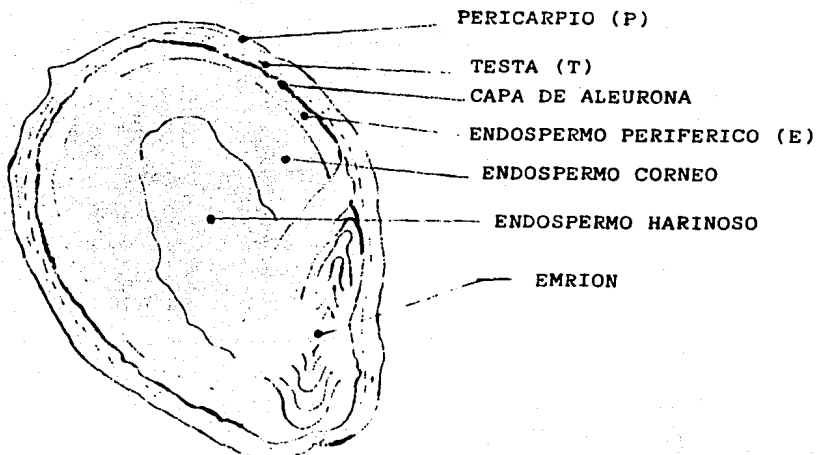
En 1950 se establece que la planta de sorgo es miembro de la familia Gramineae que está dividida a su vez en dos sub-familias: Las Panicoideas y las Festucoideas, la primera comprende a las Andropogoneas, donde se agrupan los sorgos, - -

las Paníceas que comprenden a los mijos, y las Tripsíceas en la que el maíz es el principal representante. La otra familia abarca cereales tales como el trigo, la cebada y la avena. -- (4)

Wall y Ross en el año de 1975 establecen que el tallo de sorgo está constituido por nudos y entrenudos, y que la altura de la planta varía desde 50 cm. hasta algunos metros dependiendo de la variedad de que se trate. (4,23)

En el extremo superior del tallo se encuentra una inflorescencia en racimos compuestos llamada panoja, la que puede variar desde tipos herbáceos laxos, hasta tipos compactos. La panoja presenta el mismo esquema del tallo, el eje central está dividido en nudos y entrenudos, las ramificaciones primarias aparecen en los nudos en los grupos que se vuelven a dividir hasta dar ramificaciones de tercer orden, las cuales originan una o varias espiguillas en donde se localizan los frutos llamados semillas o cariópsides.

El grano de sorgo o cariósido está formado por tres estructuras: Las cubiertas externas, el embrión y el endospermo. (Fig. 1) (.4,22)



Las cubiertas externas comprenden dos capas: el pericarpio y la testa, las que se originan de los tegumentos que rodean el óvulo antes de la megasporogénesis. (4)

El pericarpio en su parte externa, está formado por una capa de células de parénquima con paredes gruesas cubiertas por una cutícula. Las células de las dos o tres capas siguientes tienen también paredes gruesas, pero su tamaño es mayor y corresponden al epicarpio. En seguida aparece una zona ancha de células ricas en almidón, denominada mesocarpio, esta capa varía en grosor y su parte más ancha está opuesta al embrión.

Las capas internas del pericarpio (endocarpio), están formadas por células de cruce que son delgadas y largas; perpendicularmente a éstas se localizan las células tubulares, siendo la función de éstas dos capas el transporte de agua durante la germinación.

La testa cuando existe, es de color café y la pigmentación puede propagarse hasta el pericarpio, dando tonalidades crema, castaño amarillento o rojizo. Hay granos blancos, con testa oscura y pericarpio no pigmentado que tienen un aspecto blanco azulado. La testa siempre se encuentra en el ovario, pero en muchas variedades es absorbida antes del desarrollo total de los granos desapareciendo en la etapa madura.

El embrión se encuentra en la base del grano y es la estructura que dará origen a las partes aérea y subterránea de la planta. (4)

El endospermo forma el tejido de reserva del grano y proporciona la energía necesaria para la germinación. El principal carbohidrato que almacena el endospermo es el almidón, en forma de gránulos. (Fig. 2) (4,22)

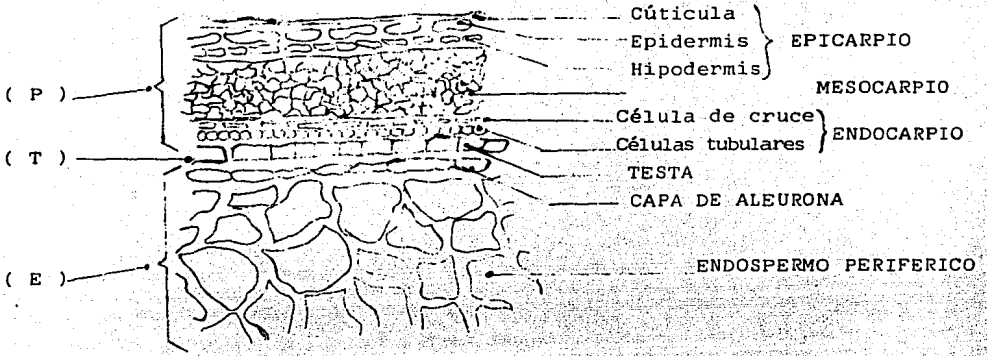


Figura 2.- Corte Longitudinal de un Grano de Sorgo.

(Rooney 1971) (22)

En el endospermo se diferencian tres zonas: una central - harinosa; con gránulos de almidón redondos y distribuidos al - azar, teniendo textura suave de baja densidad, otra traslúcida y córnea donde los gránulos de almidón son poliédricos y muy - agrupados con textura dura, y la tercera; una capa delgada periférica formada por una matriz protéica de glutelina conteniendo pequeños granos de almidón. (fig. 2) (4,22)

Existe una capa de aleurona que rodea el endospermo y que está formada por vacuolas con gran cantidad de proteína en forma cristalina, entre sus funciones principales se encuentra la sintetizar las enzimas hidrolíticas para la degradación del almidón en azúcares simples, que serán utilizados durante la germinación del grano mediante reacciones anabólicas. (4)

Una característica común en todos los sorgos híbridos comerciales es que poseen pigmentos fenólicos que le dan un color determinado al grano de cada variedad, entre estos grupos fenólicos se encuentran los taninos, los cuales pueden afectar el valor alimenticio del sorgo.

TANINOS.

La palabra "tanino" abarca un gran número de sustancias que presentan propiedades fisicoquímicas en común, pero que no guardan relación estructural en sus fórmulas químicas.

A fines del siglo XVIII se introdujo éste término para designar a los compuestos capaces de curtir pieles, convirtiendo éstas en cueros impermeables, sin embargo, lo anterior se atribuyó a cambios físicos más que a reacciones químicas entre fenoles y proteínas. Con el descubrimiento de compuestos fenólicos como : fenol, cresol, catecol, guayacol, eugenol, urushina y pirogalol, en diferentes tejidos vegetales, el vocablo fué usado para designar genéricamente a éstos pero sin haber probado su habilidad curtidora. (4,27)

Así, la palabra tanino se ha usado para designar a las sustancias con las propiedades generales de los fenoles y en base a su habilidad para adherirse y precipitar ciertas proteínas involucradas en el curtido de la piel, evitando la degradación bacteriana de ésta última. Obviamente, cualquier compuesto capaz de producir dichos cambios tan drásticos en tejidos animales no debe ser de utilidad cuando existe en el alimento. En realidad, los taninos son altamente tóxicos para la mayoría de los animales, incluyendo las aves y el hombre.

En 1963 Goldstein y Swain sugieren que el término "tanino" sea reservado para aquellos compuestos fenólicos cuyo grado de hidroxilación y tamaño molecular (generalmente entre 500 y 3000) sea suficiente para formar complejos fuertes con proteínas y otros polímeros bajo condiciones apropiadas de concentración y pH. (25,29)

Químicamente los taninos son compuestos orgánicos no nitrogenados, heterogéneos, variando desde simples monómeros hasta grandes polímeros, cuyas estructuras son desconocidas en algunos casos. (4)

CLASIFICACION.

Los taninos vegetales fueron originalmente clasificados en:

- a). Taninos Hidrolizables y en b) Taninos Condensables.

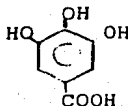
TANINOS CONDENSABLES.— Son mezclas de productos de condensación de moléculas tipo flavan, combinadas en dímeros, trímeros o polímeros, como son: oligómeros de polihidroxi-flavan-3,4-dioles (Creasy and Swain, 1965) (Harbone, 1967), o bien, polímeros de hidroxiflavan-3 oles (conocidos como catequín taninos). (4,24)

Los taninos condensables tienen la propiedad común de formar precipitados amorfos de color rojo en soluciones ácidas -- (éstos son llamados flovafenos o taninos rojos).

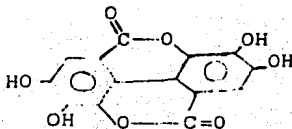
TANINOS HIDROLIZABLES.— Son ésteres de azúcares y ácidos fenólicos o de sus derivados, los que pueden ser hidrolizados fácilmente por medios químicos (soluciones ácidas), enzimáticos o por calor, y muchas veces la hidrólisis ocurre en forma espontánea durante la extracción o purificación de éstos como puestos.

Los Taninos Hidrolizables se subdividen en:

- 1.- Galotaninos, los que por hidrólisis producen ácido gálico como único compuesto fenólico, más el azúcar con el cual forman glucósido.
- 2.- Elagitaninos.— Los que bajo las mismas condiciones dan además del ácido gálico otros de sus derivados de los cuales el principal es el ácido elágico, más el azúcar del glucósido. (4,24)



Ac. Gálico



Ac. Elágico.

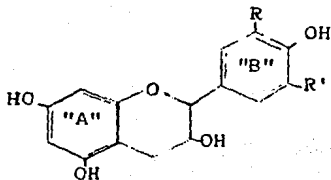
El principal representante de los galotaninos es el Ácido Tánico, el cual es una mezcla de derivados del ácido gálico. White en 1958 analizó su composición por cromatografía bi dimensional encontrando: 21% de ácido gálico, 7% de ácido m-digálico, 3% de pentagaloiil-glucosa, 1% de ácido trigálico- y el resto en forma de glucósido como galotanino, conteniendo de 8 a 10 moles de ácido gálico por mol de glucosa. (4)

Los taninos condensables han sido poco estudiados debido a la dificultad de analizar las grandes moléculas por cromatografía, ya que estas reaccionan con la celulosa del papel con los polímeros utilizados como soporte en capa fina, dando manchas difusas por la formación de complejos moleculares. (4,24)

Los únicos compuestos que pueden ser separados satisfactoriamente son los flavanones monoméricos y algunos dímeros, pero es muy difícil obtenerlos puros debido a la facilidad que tienen de formar puentes de hidrógeno con otras moléculas.

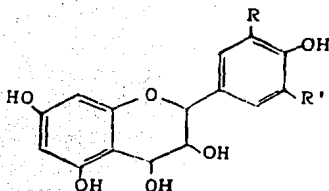
Los dos grupos más importantes de flavonoides que forman los taninos condensables son los flavan-3-oles o catequinas y los flavan-3-4 dioles o leucoantocianidinas. (21)

Freudenberg (1962) demostró la relación existente entre las catequinas y otros flavonoides, teniendo la estructura común del 2-fenilcromano, con los grupos hidroxilo formando en el anillo "A" una unidad de resorcinol o floroglucinol, y en el anillo "B" una de catecol. Por reacciones de degradación y síntesis estableció la estructura de las catequinas como:



afcelequina, cuando $R=R'=H$
catequina, cuando $R=OH$; $R'=H$
galocatequina, cuando $R=R'=OH$

En un principio, las leucoantocianidinas fueron consideradas como glucósidos de pseudobases de las antocianidinas y fueron King y Bottomly en 1953 quienes confirmaron la estructura flavan-3,4 diol para las leucoantocianidinas. (3,4)



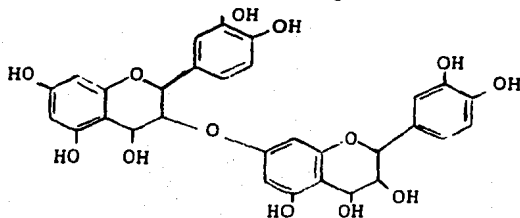
Leucopelargonidina, cuando $R=R' =H$

Leucocianidina, cuando $R=OH: R'=H$

Leucodelfinidina, cuando $R=R'= OH$

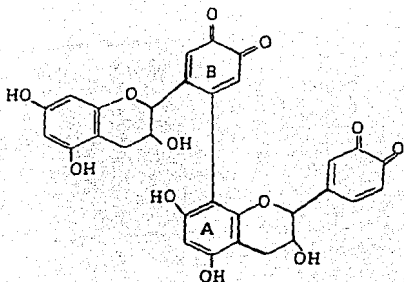
En realidad las leucoantocianidinas se encuentran tan extendidas en los vegetales, que son las responsables de las reacciones atribuidas a los taninos. (3)

Los taninos condensados vegetales son mezclas de varios polímeros, producto de la condensación de las catequinas y de las leucoantocianidinas, y se ha propuesto que la condensación de la molécula se realiza por unión tipo C-O-C, entre el grupo OH del carbono 3 ó 4 de una molécula de flavanol y el OH del carbono 7 de una segunda molécula (14)



En 1962 se sugiere que la condensación es debida a la oxidación catalizada por la enzima polifenoloxidasas, lo que da al anillo "B", un carácter electrofílico y puede reaccionar con el anillo "A" nucleofílico de un segundo flavanol, -

dando una estructura como: (13) (Hathway).



PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS TANINOS.

Los radicales fenólicos a semejanza de los alcohólicos -- son el sitio de formación de enlaces por puentes de hidrógeno. Los efectos de éste tipo de uniones modifican las propiedades físicas como son: Los puntos de ebullición, fusión y su solubilidad, además de los espectros de absorción en el ultravioleta e infrarrojo.

Los compuestos fenólicos forman complejos con los metales, en especial con el fierro y el aluminio, dando coloraciones oscuras, esta propiedad es usada en identificación de cromatogramas y en el análisis espectrofotométrico. La estabilidad de -- los complejos depende de las estructuras. de los grupos involucrados, los formados con grupos o-dihidroxicarbonil son más estables que los formados con grupos o-difenoles, por esta razón los quelatos entre fierro y flavonoles son más estables que entre el metal y fenoles simples. (4,27)

INTERACCION CON PROTEINAS.

En la célula viva, los taninos generalmente se encuentran asociados a vacuolas, protegiendo al protoplasto contra la ---

deseccación, putrefacción y destrucción por microorganismos como bacterias y hongos. En general se acumulan en células situadas cerca de heridas o infecciones. La propiedad esencial de los taninos de combinarse con las proteínas y otros polímeros, como la celulosa y la pectina, es importante por la inhibición enzimática producida. La sensación astringente que dan los polifenoles es debida a la precipitación de glucoproteínas encontradas en la saliva, reduciéndose así su propiedad lubricante. -- (Esau) (11).

Loomis y Battaille (1966) indican que en la formación de complejos tanino-proteína o tanino-otro polímero están involucrados tres tipos de enlaces químicos.

- a).- Enlace por puente de hidrógeno entre el grupo fenólico de los taninos y grupos receptores del polímero o la proteína. (-NH, -CO, -OH).
- b).- Enlaces iónicos entre los grupos aniónicos de los taninos (fenólicos ionizados o carboxil) y grupos catiónicos de las proteínas, como el E-amino de la lisina.
- c).- Enlaces covalentes formados por la unión entre quinonas, (las que pueden estar formando parte de la estructura del tanino o pueden ser producidas por la oxidación,) y grupos reactivos en la proteína, dando gran estabilidad al complejo tanino-proteína.

En experimentos donde se han analizado los tipos de uniones, se ha visto que las dos clases de taninos muestran respuestas diferentes a cambios de pH. Los taninos condensados forman enlaces por puentes de hidrógeno a pH inferiores de 7-8, lo que indica que las uniones están formadas entre grupos hidroxifenólicos no ionizados y grupos amino de la proteína, en tanto que los hidrolizables presentan este tipo de enlaces más fuertes a pH 3-4, pero se debilitan a pH 5 o más alto, esto sugiere que los más estables estén formados por grupos carboxilo no ionizados, en tanto que los inestables se formen por grupos hidroxilo no ionizados. (4,17) (Loomis y Battaille).

Algunos autores citan evidencias de enlaces covalentes entre las quinonas y las proteínas por medio de los grupo sulfhidrilo de aminoácidos sulfurados, grupos imino de la prolina o -- grupos amino libres. El producto inicial es un complejo catecol-o-quinona-proteína, el que es oxidado rápidamente por quinonas libres, dando quinona-proteína, éstos compuestos pueden dar origen a cadenas cruzadas de quinona-proteína resultando uniones en forma de red, como las presentadas en el caso de la cutícula y algunas estructuras rígidas de los invertebrados (4,17) .

ASPECTOS NUTRITIVOS DEL SORGO RELACIONADOS CON LOS TANINOS.

Como regla general, el sorgo tiene un valor igual al 95-100% del maíz en la alimentación del ganado, esto, dependiendo del ganado en especial de que se trate. En muchas pruebas, el sorgo ha demostrado ser igual que el maíz cuando es bien procesado. Cuando el sorgo se mezcla con el maíz el resultado, muchas veces es mejor que maíz o sorgo solos. (5)

A continuación se muestran algunos usos del sorgo en raciones alimenticias para diversos animales:

- 1.- Ganado Vacuno para Carne.- Se puede usar sorgo en raciones para proveer energía tanto de mantenimiento como de finalización. Generalmente, si el grano es procesado, se observará una mínima diferencia cuando éste es substituido por otro cereal. El sorgo es usado como único grano en raciones de finalización con resultados satisfactorios.
- 2.- Ganado Lechero.- Cuando es bien formulado, la ración de sorgo, puede sustituir a cualquiera de los otros cereales, con una mínima diferencia.
- 3.- Ovejas.- El único método que ha sido efectivo para raciones de ovejas es el proceso de "dry rolling". Los otros métodos parece que son menos efectivos en raciones de finalización para ovejas que en el mismo tipo de raciones para ganado.

- 4.- Cerdos.- El sorgo es un alimento excelente para cerdos, y puede sustituir a cualquiera de los granos cereales en las raciones de esta especie en todas las edades. La cantidad sustituida puede ser de 10% o menor, o bien reemplazarse completamente. Pruebas recientes muestran que el cerdo que ha sido alimentado con sorgo produce un porcentaje más alto de carne roja que aquel alimentado con maíz. (5)
- 5.- Aves de corral.- Raciones para aves de corral que contienen más de un sesenta por ciento de grano de sorgo, se usan con éxito para alimentar pollos tiernos, pavos, pollitos y gallinas; cuando ciertos niveles nutritivos se cumplen al momento de formular las raciones. Debido a que existen diferencias en producción y precipitación pluvial en las áreas de cultivo, el contenido de proteína del sorgo puede variar. Pero cuando se hacen análisis para establecer el nivel de proteína del grano, la dieta puede ser balanceada económicamente agregando un suplemento proteínico adecuado. Se recomienda que antes de mezclarlo con otros ingredientes, se muele finamente.

En base a energía: el sorgo es igual que el maíz. En cuanto a costo por unidad de caloría, el sorgo es muchas veces mejor que el maíz. El contenido de xantofila del sorgo es bajo pero este compuesto puede ser agregado económicamente mediante la adición de harina de alfalfa, o gluten de maíz. Actualmente el sorgo híbrido bajo en taninos ha vencido la discriminación histórica por causa del mal sabor. (5)

En nuestro país son cultivadas diversas variedades de sorgo con diferente contenido de taninos, compuestos que tienen la propiedad de proporcionar astringencia y sabor amargo al grano, lo que provoca una disminución en el ataque de los pájaros hacia el grano antes de la cosecha. Diversos estudios realizados en aves han demostrado que los sorgos con ele-

vada concentración de taninos poseen menor energía metabolizable (Nelson et al, 1975), disminuyen la ganancia de peso y aumenta la conversión alimenticia. (Pro y Sosa, 1980) la disponibilidad de los aminoácidos de tales sorgos se disminuye (Nelson et al, 1975) y además se les ha relacionado con otro tipo de problemas como: malformaciones de los huesos de las patas de las aves. (Elkin et al, 1978). (19)

Recuérdese que los taninos del sorgo pertenecen a un grupo de compuestos orgánicos con un peso molecular entre 500 y 3000 conteniendo suficientes grupos hidroxilos, de 1 a 2 por ciento de peso molecular, capaces éstos de formar enlaces transversos con proteínas y otras macromoléculas.

Varios compuestos han sido estudiados con el propósito de contrarrestar el efecto negativo de los taninos tales como: Las suplementaciones de colina y metionina que han podido disminuir la reducción del crecimiento en aves ocasionada por el consumo de sorgo alto en taninos. (Chang et al, 1964). Adiciones de polivinil pirrolidona también han mostrado que mejoran el crecimiento de aves cuando estas se alimentan con dietas que contienen sorgo con alto contenido de taninos (Armstrong et al, 1973). (6,18)

En ratas se han observado que el tratamiento del sorgo alto en taninos con NaOH al 20% a 70°C por 5 minutos, ha mejorado el crecimiento hasta 11 veces con respecto a muestras de sorgo sin tratar, (Cummings et al, 1973). (18)

En la actualidad las variedades de sorgo que se explotan en México, son variedades que han sido obtenidas pensando en su rendimiento, resistencia al ataque de pájaros, pero poco se ha hecho en base al valor nutritivo de este grano. Recientemente, se está trabajando en la producción de variedades nacionales, acordes a las necesidades del país, también se sabe que en la actualidad los fitomejoradores pueden manipular con relativa facilidad, el contenido de taninos de sorgo. Sin embargo, para definir el nivel de taninos deseable en las futuras variedades que se produzcan en México, es necesario conocer las características nutritivas de las que actualmente se explotan, ya que

la presencia de taninos tiene efectos benéficos y detrimentales.

No hay que olvidar que existen incentivos económicos para producir sorgo con alto contenido de taninos, ya que su presencia hace al grano menos susceptible al ataque de los pájaros, ---pués los daños que éstos generan son considerables.

También se ha señalado que la presencia de taninos disminuye la susceptibilidad del grano a una germinación de precosecha (Harris y Burns, 1970), de igual manera los taninos reducen el ataque de hongos. (18).

A continuación se resumen algunas de las investigaciones realizadas en torno a éste problema.

1.- Utilizando la técnica de Hill y Anderson (1958); -- Eguiarte (1976) determinó la energía metabolizable de cinco variedades de sorgo cultivadas en Sayula, Jal., encontrando que a menor contenido de taninos, el valor de energía metabolizable era mayor, como se puede apreciar en el cuadro siguiente:

VALORES DE ENERGIA METABOLIZABLE DE SORGO CON DIFERENTES CONTENIDOS DE TANINOS.

SORGO	% TANINOS	KCAL E.M./g
FUNK'S	8.18	3.90
F-61	0.24	3.88
E-59	0.26	3.73
Br-64	1.18	3.70
MASTER-3	1.70	3.34

El valor de energía metabolizable mayor se obtuvo con la variedad FUNK'S y el valor más bajo con la variedad MASTER-3 encontrándose entre las variedades diferencias significativas - (p 0.05).

En trabajos subsecuentes Suárez en 1977 encontró que el sorgo de variedad Master-3 con alto contenido de taninos, produjo una reducción del crecimiento y aumento en la conversión alimenticia, comparado con pollos en iniciación alimenticia con la variedad F-61 con dietas a base del 12% de proteína. Los resultados de este experimento se presentan en el cuadro A. Resultados similares, fueron obtenidos por Sosa et al. (1979) con dietas a base de sorgo-soya con 14.3% de proteína. al estudiar el comportamiento de pollos de engorda en iniciación alimentados con sorgo Br-64 de alto contenido de taninos de dos productores diferentes, frente a una variedad de bajo contenido de taninos -- (18, 27)

CUADRO A.- EFECTO DE DOS NIVELES DE TANINOS SOBRE LA GANANCIA DE PESO, CONSUMO DE ALIMENTO Y CONVERSION ALIMENTICIA DE AVES ALIMENTADAS CON DIETAS DE 12% DE PROTEINA..

NIVEL DE TANINOS EN LA DIETA	GANANCIA (g)	CONSUMO DE ALIMENTO(g)	CONVERSION ALIMENTICIA.
F-61 0.10 %	313.2	815.3	2.60
MASTER-3 0.60 %	253.7	710.6	2.80

SUAREZ (1977)

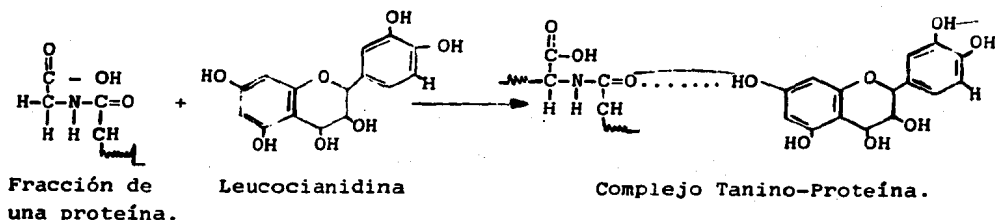
(P < 0.05)

Suárez (1977) y Sosa et al. (1979) al aumentar el contenido de proteína de la dieta a 20 y 19% respectivamente encontraron que los efectos detrimentales de los taninos observados a niveles subóptimos de proteína de 12 y 14% desaparecían parcialmente. En el cuadro B, se puede apreciar que la ganancia de peso de las aves alimentadas con sorgo de alto contenido de taninos fueron iguales al de las aves que recibieron sorgos dulces, sin embargo, la conversión alimenticia no fue mejorada al aumentar el contenido de proteína. (18,27)

CUADRO B.-GANANCIA DE PESO, CONSUMO DE ALIMENTO Y CONVERSION ALIMENTICIA DE LAS AVES A LOS 21 DIAS DE EXPERIMENTACION.

TRATAMIENTO	DIETAS CON 19% PROTEINA CRUDA		
	GANANCIA (g)	CONSUMO (g)	CONVERSION
SORGO DULCE	392.0	521.6	1.33
SORGO AMARGO, Br-64	400.6	685.2	1.71
SORGO AMARGO, Br-64	443.8	763.3	1.72

Es sabido que los taninos del sorgo tienen una gran afinidad por combinarse con proteínas a través del hidrógeno de sus grupos hidroxilo y el oxígeno del grupo ceto-imido de la proteína, formando enlaces de hidrógeno como se muestra en la siguiente figura : (18)



Es probable que mediante este mecanismo, se forme un complejo tanino-proteína con enlaces transversos, lo que limita la disponibilidad de la proteína para el animal. Algunos trabajos han demostrado que los taninos inhiben la acción de algunas enzimas, posiblemente por un mecanismo similar al anterior. Tamir y Alumont (1969), demostraron que los taninos extraídos del algarrobo inhibieron la acción de las enzimas digestivas, α -amilasa, lipasa y tripsina en ratas. Maxon et al (1973) -- han informado que ratas alimentadas con sorgos oscuros exhibieron inhibición de α -amilasa; posiblemente esto explica - - -

el aumento en la conversión alimenticia con las dietas con alto contenido de taninos, observados en los experimentos que se resumieron aquí y también ayude a comprender la reducción en el contenido de energía metabolizable de los sorgos con alto contenido de taninos presentados anteriormente. (18)

Es importante señalar que la reducción en el crecimiento de los pollos observados en dietas con 12 y 14% de proteínas. -- sea debido en parte al efecto astringente de la dieta ocasionado por los taninos, lo que originó que los pollos consumieran una menor cantidad de alimento como se puede observar en los cuadros A y B. Sin embargo, tal efecto no se notó cuando el nivel de proteína se aumento a 19% ya que la ganancia de peso no se afectó, pero en cambio la conversión alimenticia aumentó de manera notable. Muy recientemente, se han publicado datos relacionados con el contenido de taninos y de almidón del sorgo y han encontrado que las variedades de sorgo con alto contenido de taninos contienen relativamente menor cantidad de almidón que las variedades dulces. Estos datos indicarían que la causa de un menor valor energético en los sorgos amargos, no solo puede ser atribuida a la acción inhibitoria de los taninos sobre las enzimas, sino también a su menor contenido de almidón. (7)

Los estudios realizados por Elkin et al (1978) sobre la etiología de patas anormales observadas en pollos alimentados con dietas a base de sorgo alto en taninos, no han podido ser corregidos por suplementaciones de vitaminas y minerales. Estos investigadores han informado que la mineralización del hueso no se afecta aparentemente por los taninos, como se demostró por el mismo contenido de cenizas en pollos alimentados con sorgo alto o bajo en taninos. Estos autores plantean como hipótesis, que esta anomalía de las patas se debe a una alteración de la matriz orgánica del hueso ocasionada por la combinación de los taninos con la colágena del hueso. (18).

Se han propuestos varios mecanismos y estos se han recopilado en una revisión excelente de literatura científica sobre taninos y nutrición: (Referencia: Tannins and Nutrition 1980. Por - due University west Lafayette, Indiana E.U.A).

- 1.- Depresión de consumo de alimento: Aunque bajo determinadas circunstancias se puede presentar una reducción en el consumo de alimento, cuando el alimento contiene taninos el crecimiento se reduce inclusive cuando se iguala el consumo de alimento. También en ensayos de energía metabolizable verdadera, cuando el consumo de alimentos constante, los sorgos de contenido alto en taninos - poseen valores energéticos inferiores a las variedades de concentración baja en taninos.
- 2.- Complejos taninos-proteína del alimento disminuyendo su disponibilidad para digestión y absorción. En muchos estudios en los que se ha añadido taninos al alimento se ha observado mayor excreta de nitrógeno y/o menor digestibilidad de las proteínas.
- 3.- Inhibición de Enzimas Digestivas: Como las enzimas digestivas son proteínas y en vista que los taninos forman complejos con las proteínas, no es sorprendente que la acción de muchas enzimas se haya encontrado inhibida en la presencia de taninos. Entre estas enzimas tenemos tripsina, lipasa y amilasa que son importantes en la digestión de proteínas, grasas y almidones, respectivamente.
- 4.- Efecto de los taninos sobre el Sistema Digestivo: En los estudios en que se ha demostrado daño en el sistema digestivo se ha usado ácido tánico como la fuente de taninos. Como no puede concluirse que los taninos presentes en el sorgo tendrían el mismo efecto sobre el sistema digestivo, estos resultados deben interpretarse con cautela. (25)

De todos los estudios realizados y revisados anteriormente se podría decir que los sorgos con alto contenido de taninos -- tienen un valor energético menor que las variedades de sorgo -- dulce, por lo tanto es importante que sea considerada esta limitación cuando el nutriólogo formule.

Aunque en la práctica se utilizan mezclas de sorgo para la alimentación de los animales y no variedades puras, sería conveniente investigar los rangos de energía metabolizable en mezclas de sorgo empleadas comercialmente para conocer mejor los valores de energía de este cereal. (18)

ENERGIA METABOLIZABLE DEL SORGO.

La prueba de energía metabolizable verdadera (con corrección para nitrógeno) se usó para comparar el contenido energético entre variedades de sorgo con contenido alto y bajo en taninos. El promedio de las cuatro variedades de sorgo bajo en taninos fué de 3,770 kcal/kg (en base a materia seca) El valor promedio obtenido para una variedad de sorgo alto en taninos fué de 5% y 10% menor, estando los valores de energía metabolizable verdadera, relacionados inversamente con el valor de inclusión de sorgo en la dieta. El valor de 3,770 kcal/kg es aproximadamente 3% inferior al valor de la energía metabolizable del maíz amarillo.

El factor principal responsable del bajo valor energético -- para el sorgo alto en taninos fué el elevado contenido de energía en la excreta de las aves de este tratamiento (3.81 kcal/g vs 3.44 kcal/kg para los tratamientos con sorgo bajo en taninos). Esta diferencia sugiere una inhibición del proceso digestivo a causa de los taninos, como se discutió previamente.

A pesar de que los efectos de la toxicidad de los taninos -- en aves están bien documentados, existe desacuerdo en cuanto a la forma como estos compuestos ejercen su efecto dañino. (25)

5.- Toxicidad Post-Absorción ; Una vez más, el ácido tánico se ha usado como la fuente de taninos en los estudios - que han demostrado la absorción de éstos y los trastornos metabólicos que se producen en el organismo después de su absorción. (25)

METODOS ANALITICOS.

El presente trabajo tiene como objetivo la realización - de un estudio cuantitativo de los niveles de taninos en varias muestras de sorgo (Sorghum bicolor), mediante tres métodos - con el fin de conocer cual es la verdadera situación en cuanto a este tema, y de ésta manera poder establecer en un momento de terminado cual sería el método más adecuado para la cuantificación de los taninos en el sorgo. Al mismo tiempo, ya conocido y establecido un método óptimo, se tratará de asentar el procedimiento o tratamiento del sorgo a seguir, para la eliminación -- (aunque sea parcial) de los taninos del sorgo para así minimizar los problemas más comunes que éstos acarrearán cuando los -- animales son alimentados con sorgo puro o con mezclas del mismo con otros cereales o materiales alimenticios.

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA TANINOS.

DETERMINACION DE TANINOS.

Sobre la base de principios químicos y físicos, los métodos de análisis de taninos se pueden agrupar como sigue:

- 1.- Precipitación por Reactivos Inorgánicos. Por ejemplo:
Acetato de cobre, sales de amonio, zinc, plomo y cobre.
- 2.- Precipitación por Reactivos Orgánicos. Por ejemplo:
Cinconina, gelatina y formadehído.
- 3.- Formación de Productos Coloridos. Por ejemplo:
Reactivo alcalino fosfotungstato-fosfomolibdato (Folin - Denis), Cloruro Férrico, Acido vainillina, p-nitroanilina - diazotizada y ácido nitroso.
- 4.- Oxidación con Permanganato o Ferricianuro en base volumétrica.

Nuevos métodos hacen uso de la espectroscopia UV, de la -- fluorometría y la nefelometría.

Todos estos métodos son inespecíficos, sin embargo, ellos son muy usados por los científicos en alimentos ya que se correlacionan bien con el grado de astringencia como determinación -- sensorial. La determinación de el "contenido activo de taninos" es una medida muy significativa. Este es expresado en unidades - estandar determinadas por un método basado en el efecto de los - taninos sobre la diastasa, pues se ha encontrado que la diastasa es precipitada e inactivada por los taninos, de tal forma que los resultados obtenidos se pueden correlacionar con la astringen -- cia. (24).

De entre los varios métodos disponibles para la determinación de taninos, los procedimientos oficiales del AOAC incluyen el método colorimétrico de Folin-Denis para bebidas alcoholicas-

destiladas y vinos, y el método del Permanganato reducido (o de oxidación con $KMnO_4$) para té, clavo, especias y pimienta.

METODO COLORIMETRICO DE FOLIN-DENIS.

Folin y Denis (1912) propusieron un método colorimétrico basado en la reducción del reactivo de ácido fosfomolibdico - tungstato en solución alcalina como un reactivo general de fenol y aplicado éste a la determinación de tirosina en proteínas y de vainillina en extractos de vainilla. Posteriormente se modificó el reactivo para incrementar la sensibilidad de reducción por la incorporación del contenido de molibdato y la adición de sulfato de litio para prevenir la precipitación de un complejo de sal de sodio. Subsecuentemente este procedimiento fué modificado por varios investigadores aplicándose tanto en vinos como whisky. (24).

La reacción está basada en el hecho de que el ácido fosfotungstomolibdico es reducido por compuestos taninos en solución alcalina, produciendo una solución colorida azul oscuro. La intensidad de este color puede ser medida espectrofotométricamente a 790 nm. en el rango entre 0.1 y 1.0 mg. de ácido tánico por -- 100 ml.

El aparato usado es un espectrofotómetro en el cual la -- absorbancia es leída a 760 nm. con un blanco donde todos los -- reactivos son empleados a excepción del ácido tánico.

La intensidad del color alcanza su máximo después de 25 mi nutos a temperatura ambiente y es estable al menos por 3 horas - más. (24).

El método original del AOAC produce un color azul, el cual se desvía considerablemente de la ley de Beer's para concentra - ciones de ácido tánico mayores de 0.35 mg/100 ml. Ajustes en la concentración del ácido fosfotungstomolibdico y en la del carbonato de sodio, pueden producir una línea que muestra sólo, una li gera desviación para concentraciones de ácido tánico mayores de 1mg/100 ml. Acido tánico de un alto grado de pureza (USP) puede producir una relación lineal. (24).

METODO LOWENTHAL O DE OXIDACION CON KMnO_4 EN BASE VOLUMETRICA.

Los métodos basados en el poder oxidante del KMnO_4 son numerosos y de fácil ejecución en su mayoría; sin embargo, existe el inconveniente de que la estabilidad de las soluciones de permanganato solamente se logran mediante técnicas especiales en su preparación. Para obtener una solución estable, es necesario que es té libre de peróxido y por lo tanto también de sustancias reductoras; en estas condiciones, se puede preparar ya, una solución de permanganato cuyo título permanece constante durante varios meses.

El método Lowenthal (1877) consiste en la oxidación de taninos y compuestos relacionados presentes en un extracto acuoso de los tejidos de frutas con una solución de ácido permangánico. El método fué inicialmente descrito por Neubauer en 1872, -- quién tituló un extracto antes y después de la precipitación de "taninos" con gelatina en presencia de Kaolin. (24).

Posteriormente fué reportada una modificación del método -- al extraer los taninos por adsorción sobre negro de humo, pero -- ya que la oxidación de taninos por permanganato en solución ácida es lenta y el punto final de la titulación indefinido; se incluyó el indigo carmín como un indicador.

Debido a que otras sustancias además de los taninos reducen el permanganato, se necesita una técnica diferencial para -- comparar las sustancias reductoras adsorbidas contra las sustancias reductoras de fondo.

Las limitaciones a éste método fueron reconocidas más adelante por varios investigadores, las dificultades son en parte -- que la precipitación de taninos es variable y no cuantitativa y que la solución ácida de permanganato oxidará a orto o para dihidroxibenceno derivados, pero normalmente no oxidará monohidroxio metadihidroxio-derivados. La solución de permanganato se titula con ácido oxálico pero se estadariza contra los tipos de taninos presentes en la muestra, si se hace así, los cambios en la as -- tringencia que se detectan sensorialmente durante la maduración se correlacionan muy bien con los taninos determinados por éste

método en manzanas, cerezas y uvas .

VERSION PRO-METODO DEL METODO LOWENTHAL.

Una evaluación comparativa del método anterior fué hecha en 1955. Los dos métodos fueron comparados con sustancias fenólicas puras, taninos comerciales y taninos de frutas de varios estados de maduración, y se encontró que la medición del potencial redox durante la titulación Lowenthal no es útil, y que posiblemente - la titulación pueda ser seguida colorimétricamente, observando - el cambio de absorción durante la titulación cuando el máximo a 610 nm desaparezca y un máximo a 400 nm aparezca.

Con ácido tánico USP como estandar para los dos métodos, el método Lowenthal da muy bajo resultados con resorcinol y muy alto resultado con quinol. El método Pro da altos resultados con - taninos comerciales. Los taninos de frutas muestran mejor correlación entre los métodos, posiblemente porque una mezcla de sustancias esté presente. (24).

EL USO DE CLORURO FERRICO EN PROCEDIMIENTOS COLORIMETRICOS. (Formación de productos coloridos)

En 1934 se desarrolló un método basado en el uso de cloruro férrico, para el análisis de taninos particularmente en el vino, donde la reacción es llevada a cabo bajo condiciones ácidas. Más recientemente se desarrolló un método en el cual se lleva a cabo la reacción a un pH=10. El color obtenido es medido colorimétricamente con un espectrofotómetro UV/V, y la relación entre la concentración y la extinción resulta lineal para el rango de 25-150 mg de taninos por litro. (24).

Un método el cual da resultados relativamente similares con cloruro férrico, es un método más reciente, usando el reactivo - de fierro preparado con citrato férrico amoniacal. Las solucio - nes estandar pueden estar hechas de una mezcla de pirogalol en - agua. El método es un poco más específico que el de Folin-Denis o el de Formaldehido-HCl y da una coloración característica de - fenoles y ácido hidroxámico.

El color después de 30 minutos de reposo, es leído a 725 nm, sin embargo, el método no es muy sensible a bajas concentraciones de taninos. (24)

METODO REACTIVO DE VAINILLINA-FENOL.

(Formación de productos coloridos)

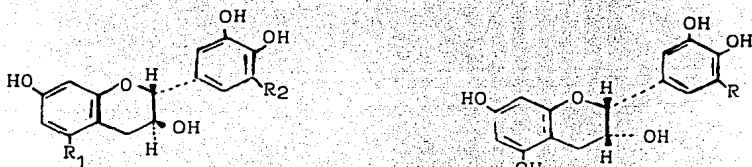
En la caracterización de compuestos fenólicos presentes en frutas, en 1959 se introdujo el uso de una solución de vainillina al 1% en ácido sulfúrico al 70% (v/v) para la determinación de flavonas que contengan un grupo floroglucinol. Más tarde se introduce el uso de vainillina en ácido clorhídrico concentrado. para la detección de floroglucinol en taninos y posteriormente - se usó este reactivo para detectar la presencia de Leucoantocianinas y catequinas. De lo anterior, se encontró que el reactivo-ácido sulfúrico-vainillina da colores mas estables que el reactivo ácido clorhídrico-vainillina. (20, 24).

Usando el primer procedimiento pero reduciendo las cantidades de los reactivos a la mitad, un mililitro de una solución con teniendo de 1-150 μ g de reactivo fenólico es colocado en un matraz Erlenmeyer de 10 ml., se agregan dos ml de reactivo de vainillina con una bureta en un lapso de 5-10 segundos después de agitar el matraz bañando con agua fría, se permite reposo por 15 minutos y entonces se lee la absorbancia en una celda de 1 cm., en un espectrofotometro UV/V contra un blanco (que contiene -- agua) a 480-550 nm. Dependiendo del máximo de absorbancia del ión carbonio formado. La catequina es usada como estandar de comparación.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el método anterior y después de varias investigaciones, los fenoles de las plantas se pueden dividir en tres grupos en base a la reacción de la vainillina:

- 1.- Los que dan valores altos de absorbancia (Floroglucinol catequina y epicatequina) con una λ máxima de 500 nm.

- 2.- Los que dan valores bajos de absorbanca con λ máxi
ma de 520 nm. (Resorcinol, pirogalol y brazilin).
- 3.- Los que no dan coloración (Acido gálico y quercitina)



Catequina: R₁ = OH, R₂ = OH.

Epicatequina: R = H.

Se encontró también que el reactivo de vainillina actúa solamente con anillos bencénicos sustituidos, y al mismo tiempo se confirmó que el reactivo de vainillina reacciona aproximadamente de una manera estequiométrica con compuestos que contengan el grupo floroglucinol. (24)

Se han utilizado métodos para determinar taninos en granos de sorgo. Así, en 1956 se usaron 5 variedades de sorgo para -- comparar con procedimiento colorimétrico diferencias de taninos en los granos. De los métodos colorimétricos, sólo el del reactivo de Folin-Denis y del arsénico-tungstato fueron encontrados satisfactorios. (20)

En 1979 se estudió la relación entre el contenido de taninos y la digestibilidad de materia seca in-vitro del grano de sorgo. Los taninos fueron determinados por el método de vainillina-HCl (V-HCl) descrito en 1963 para la determinación de taninos en forraje. Modificandose este método en 1971 para permitir una rápida estimación y contenido de taninos en el grano de sorgo (20)

En 1972, se usaron dos métodos de análisis de taninos para medir el contenido de ellos en sorgo. Estos dos métodos fueron:

- 1.- El método V-HCl
- 2.- El método de Sulfato de Amonio Férrico. (FAS)

El método FAS tiende a medir taninos hidrolizables mientras que el método V-HCl mide taninos condensados. De cualquier manera existe una super-posición entre los resultados obtenidos por estos dos métodos y se dice que ninguno de los dos mide claramente sustancias definidas. Los resultados del método V-HCl son representados en equivalentes de catequina, y los del método FAS - en equivalentes de ácido tánico. (20)

Por otra parte, existen además otros métodos que se han desarrollado con el fin de dar una estimación rápida del contenido de taninos del sorgo:

METODO DE CINCONINA-TANATO.- Este procedimiento es el método de control de calidad mas usado en los productos del cacao. - Fué introducido por Chapman en 1908, quien determinó los taninos en productos de cacao precipitando primero los taninos como cinconina-tanato, pesando después de secar y mediante un factor derivado especial convirtió el peso del precipitado en la correspondiente cantidad de taninos. (24)

METODO COBRE-ACETATO.- En la determinación de taninos por el método de cobre-acetato, un 4% de solución cobre-acetato es añadido a un extracto acuoso de la muestra y calentado por 10 minutos. Se colecta el precipitado, se seca y pesa, luego se incinera y se pesa otra vez. La diferencia entre el peso del complejo cobre-tanino y el residuo de cenizas es usado para calcular el contenido de taninos. (20)

METODO HIPOIODITO DE SODIO.- El contenido de taninos de una solución original, así como de la misma solución pero después de extraer los taninos se puede determinar por la adición de una solución 0.1 N de iodo y de solución 2 N de NaOH.

Después de una hora se añade H_2SO_4 2N y el precipitado de iodo es titulado posteriormente con una solución de Tiosulfato de sodio 0.1 N. La diferencia entre el volumen usado para titular el extracto y el usado para titular la solución ya sin taninos, dará el contenido de taninos. (24)

METODO IODOMETRICO.- En 1959 se comparó el método de Folin-Denis con el método iodométrico en el cual el valor oscilativo del extracto es determinado antes y después de extraer los taninos de drogas vegetales, encontrándose una buena concordancia -- con el método colorimétrico del fosfotungstato y con el método gravimétrico estandar, mientras que los resultados obtenidos con el método gravimétrico de cobre-acetato fueron bajos. (24)

Todos los métodos usados, estan sujetos a error, debido a -- la inclusión de ciertos fenoles "no-taninos" polihídricos en las determinaciones, y estos fenoles tienen que ser determinados por separado. Parece ser que algunas de las fuentes de error más comunes son las que a continuación se mencionan:

Los análisis de taninos empiezan a ser particularmente difíciles cuando se determinan cantidades muy pequeñas de los mismos en muestra de materiales vegetales o de alimentos. Se podría decir que es generalmente muy difícil decidir si una muestra con -- tiene una pequeña cantidad de taninos o de polifenoles.

Con base a experiencias vividas, se ha dicho que no es posible determinar contenidos de taninos de 1% menos, con exactitud, con ninguno de los métodos. Cada determinación de taninos introduce un cierto error dependiendo de que tan grande o pequeña sea la cantidad de polifenoles incluida. También se ha visto que las condiciones para las determinaciones pueden no ser siempre tan -- desfavorables y generalmente en la determinación de grandes cantidades de taninos, no se introduce un error considerable. (16)

Una de las irregularidades en el método de la reducción del permanganato -- fué reportada en 1954 y más tarde en 1955 y es que: el permanganato a temperatura ambiente en solución ligeramente ácida oxidará a los orto y para-dihidroxibencen derivados pero no a los monohidroxi o metahidroxi derivados excepto en casos --

especiales. De tal forma que lo anterior influirá en los resultados dependiendo del tipo de taninos encontrados en la muestra.

(16)

Por otra parte, el reactivo de Folin-Denis es menos específico que el de KMnO_4 y reacciona con mono así como con dihidroxi - bencen derivados. Sin embargo, un gran número de sustancias reducen el reactivo a molibdeno (azul), como por ejemplo: los sulfitos, H_2SO_3 , H_2O_2 , aminas aromáticas, compuestos alifáticos in saturados, glucosa o uno muy importante: el ácido ascórbico. La reducción del ácido fosfomolibdico y del ácido fosfotungstico -- por el ácido ascórbico fué observada desde 1922.

Otra fuente de error puede ser que ocurra la oxidación de los taninos cuando se está llevando a cabo la determinación pero sin ser detectados aquellos que se hayan oxidado.

Una fuente adicional de error en el análisis de taninos esta en la extracción incompleta de los tejidos, en 1959 se encontró que la extractibilidad de leucoantocianinas del tejido de ciruela empleando metanol, decrece durante la maduración y se propuso que el radio de extractibilidad con 100-50% de metanol se use como índice de polimerización. (16)

MATERIAL Y METODOS.

El criterio seguido para el tratamiento de las muestras de sorgo se eligió atendiendo a lo reportado por J.K. Chavan y Salunkhe, quienes afirman que la extracción de taninos con una solución de NaOH 0.05 M y reposo de los granos de sorgo en la misma durante 24 hrs, será de un 84%, y que cuando se calienta a ebullición durante 20 minutos, se logra un 86% de la extracción. (8)

En el presente trabajo, para mejorar la eficiencia de la extracción y tratar de que ésta fuese completa, se utilizó el calentamiento a ebullición durante 20 minutos con solución de NaOH 0.05 M, además del reposo de los granos de sorgo durante 24 hrs. con la misma solución de NaOH.

Por otra parte, estudios realizados por Chavan, J.K. et al (1979), demuestran que el uso de sustancias como KOH extrae el 81% de taninos en 24 hrs, mientras que por ebullición durante 20 minutos se logrará una extracción del 87%. Mencionan también que a 100 °C durante 20 minutos con carbonato de sodio se remueve un 83% del contenido total de los taninos presentes en el sorgo (7).

METODO LOWENTHAL (OXIDACION KMnO_4).

= REACTIVOS =

- 1.- Solución extractora de taninos: NaOH: 0.05 N
Pesar en balanza analítica, exactamente 2 g de NaOH, disolverlos en suficiente agua destilada en un matraz aforado de un litro, aforar.
- 2.- Solución indicadora: Indigo Carmin.
Pesar exactamente 1.5 g de reactivo y disolver en 125 ml. - de agua destilada, homogeneizar calentando un poco, se deja enfriar y entonces se adicionan 12.5 ml. de H_2SO_4 , agitar, - y aforar en un matraz de 250 ml.
- 3.- Solución de Permanganato de Potasio 0.1 (KMnO_4 0,1 N).
Pesar en balanza analítica 1.33 g de KMnO_4 y disolverlos en suficiente agua destilada, aforar a un litro en matraz volu métrico, calentar a ligera ebullición por 1 minuto. Dejar - la solución en reposo por dos días, luego filtrar a través de asbesto.
- 4.- Solución Patrón de Acido Tánico.
Pesar exactamente 100 mg de ácido tánico USP, colocar en un matraz aforado de 100 ml., disolverlos con agua destilada y posteriormente aforar. (Esta solución así preparada contiene un mg de ácido tánico/ml. de solución).

DETERMINACION DE TANINOS.

El sorgo en experimentación es sometido a muestreo, primero cuarteándolo, después, separando manualmente aquellas semillas - que presenten en la cascarilla una coloración café, a café obscuro o rojiza. Una vez seleccionadas las muestras se procede a la extracción de los taninos.

Se pesan cuatro gramos de muestra (por duplicado), se colocan en vasos de precipitado de 100 ml, se agregan 25 ml de la solución extractora de taninos (NaOH 0.05 N). Calentar las -- muestras a ebullición durante 20 minutos en una parrilla, al término del tiempo, se retiran los vasos de la parrilla, el líquido sobrenadante de cada muestra se decanta a tubos de ensayo lim -- pios y secos, previamente identificados. A los granos de sorgo - tratados, se les añade nuevamente 25 ml de solución extractora, - para dejarlos en reposo durante toda una noche, al día siguiente se unen los dos sobrenadantes para formar así una solución de -- trabajo en la cual se encuentran los taninos a determinar.

TITULACION.

Los taninos extraídos, se cuantifican por titulación directa con solución de KMnO_4 (estandarizada contra oxalato de sodio) de título conocido.

- a) Colocar una alicuota de muestra en un matraz EM de 250 - ml.
- b) Agregar 50 ml de agua destilada y un mililitro de indicador Indigo Carmín.
- c) Titular con solución KMnO_4 0.1 N. El punto final de la - titulación se alcanza cuando la solución adquiera un color amarillo paja a amarillo oro.
- d) Simultáneamente, preparar un blanco con todos los reactivos a excepción de la muestra.
- e) Anotar los ml de KMnO_4 gastados.
- f) Tomar una alicuota de solución patrón de ácido tánico, - agregar 50 ml de agua destilada y 1 ml de indicador Indigo Carmín.
- g) Titular la solución patrón con KMnO_4 0.1 N hasta vire -- del indicador a amarillo oro, anotando los ml gastados.

- h) Restar los mililitros gastados de KMnO_4 0.01 N para el blanco, a las muestras problema, así como a la solución patrón.
- i) Calcular el porcentaje de taninos en la muestra, relacionando la cantidad de KMnO_4 0.1 N gastada para una alícuota de solución patrón, con los mililitros gastados para las muestras problema.

METODO DEL SULFATO FERRICO AMONIACAL (FAS).

= REACTIVOS =

1.- Solución Patrón de Acido Tánico.

Pesar exactamente 100 mg. de ácido tánico USP, colocar en un matraz aforado de 100 ml. disolverlos con agua destilada y posteriormente aforar. (Esta solución así preparada contiene 1 mg de ácido tánico / ml. de solución).

2.- Solución de Goma Arábica al 10%

Pesar 10 g de goma arábica, colocar en un matraz volumétrico de 100 ml. agregar aproximadamente 50 ml. de agua destilada. Dejar en reposo por 24 hrs. Aforar a la marca.

3.- Solución de Sulfato Férrico Amoniactal al 5%

Disolver 5 g de sulfato férrico amoniactal en suficiente - - agua destilada y aforar a 100 ml en matraz volumétrico.

4.- Solución Buffer de Acetatos 1.0 M (pH=4.6).

Disolver 24.63 g de acetato de sodio en aproximadamente 100 ml. de agua destilada, agregar 40 ml. de ácido acético glacial agitando para mezclar bien, luego aforar con agua en un matraz volumétrico de 250 ml. (si los reactivos son puros el pH deberá ser de 4.6, pero si esto no sucede, se puede ajustar al pH deseado, empleando un ácido fuerte o una base fuerte según convenga).

5.- Reactivo FAS.

Este reactivo se prepara empleando los reactivos anteriores mezclandolos en la proporción siguiente:

- Una parte de sulfato férrico amoniactal al 5%.
- Diez partes de goma arábica al 10% y
- Ochenta y nueve partes de solución buffer de acetatos con pH = 4.6

PREPARACION DE LA CURVA PATRON.

- 1.- De la solución de ácido tánico: tomar alicuotas de 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 1.8, 2.0, 2.5 y 3.0 ml en matraces aforados de 50 ml.
- 2.- A cada matraz, agregar 5 ml del reactivo FAS, aforar a la marca.
- 3.- Preparar simultáneamente un blanco, colocando 5 ml de reactivo FAS aforando con agua destilada en un matraz de 50 ml.
- 4.- Agitar cada uno de los matraces y leer la absorbancia en es - pectrofotómetro UV/V a 725 nm de longitud de onda, anotando - los valores obtenidos y graficando Abs. vs. concentración.

DETERMINACION DE TANINOS.

Se debe obtener una solución de trabajo que contenga los taninos del grano de sorgo en experimentación, por medio de extrac -- ción con NaOH 0.05 N. El tratamiento de extracción de taninos es semejante al que se describió en el método Lowenthal.

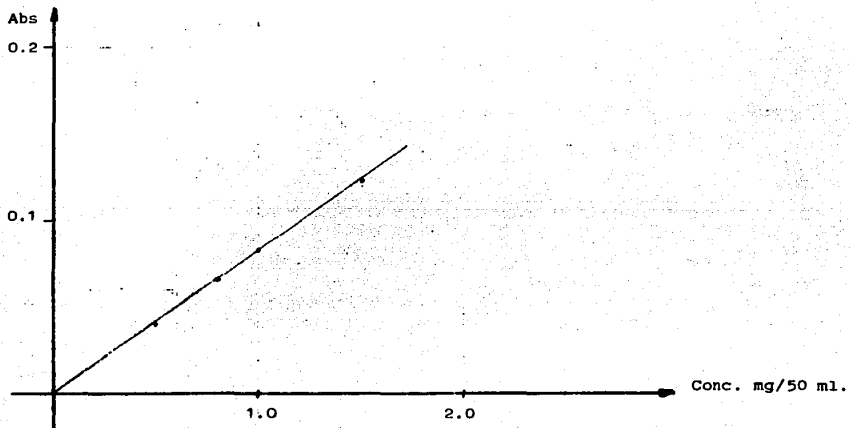
PROCEDIMIENTO.

- 1.- Coloque una alicuota de 10 ml de muestra en matraces volumé - tricos de 50 ml.
- 2.- Agregar 5 ml de reactivo FAS y aforar con agua destilada.
- 3.- Agitar los matraces y leer la absorbancia a 725 nm anotando - los valores obtenidos.
- 4.- Calcular el % de taninos en las muestras trabajadas extrapo - lando las lecturas de las mismas en la gráfica de la curva pa trón para el método FAS.

CURVA PATRON (METODO FAS).

	Vol. (ml)	ABS. (725 nm)	Conc. (mg/50 ml)
1.-	0.5	0.041	0.5
2.-	0.8	0.066	0.8
3.-	1.0	0.083	1.0
4.-	1.5	0.123	1.5
5.-	1.8	0.139	1.8
6.-	2.0	0.147	2.0
7.-	2.5	0.172	2.5
8.-	3.0	0.168	3.0

Gráfica que representa la Curva Patrón
para el método FAS (Sulfato-Férrico-Amo_nia
cal $\lambda = 725 \text{ nm.}$



METODO FOLIN-DENIS

(Reactivo Alcalino Fosfotungstato-Fosfomolibdato).

= REACTIVOS =

- 1.- Reactivo de Folin-Denis.- 100 gramos de tungstato de sodio, 20 grs. de ácido fosfomolibdico y 50 ml. de ácido fosfórico son adicionados a 750 ml. de agua destilada, ésta solución se refluja durante dos horas, se deja enfriar a temperatura ambiente y se afora a un litro (se deben tomar precauciones para evitar contaminación del reactivo con materia orgánica, además deberá protegerse al reactivo de la exposición a la luz.)
- 2.- Solución de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)
350 gramos de carbonato de sodio se disuelven en un litro de agua destilada (que ha sido calentada a $70-80^\circ\text{C}$, enfriada, reposada y posteriormente filtrada a través de fibra de vidrio).
- 3.- Solución Patrón de Acido Tánico.
Se pesan 100 mg de ácido tánico USP, se colocan en un matraz aforado de 100 ml. y se disuelven con suficiente - - agua destilada. Aforar a 100 ml. (esta solución contiene 1 mg. ac. tánico/ml. de solución).

PROCEDIMIENTO.

- a).- Un tratamiento de extracción de taninos como en los métodos anteriores se efectuó a nuevas muestras de sorgo, para obtener la solución madre con la que se trabaja para cuantificar los taninos. La cuantificación, también requiere de una curva patrón y la elaboración de la gráfica Abs vs. Conc. para extrapolar los valores de absorbancia, obtenidos para las muestras.

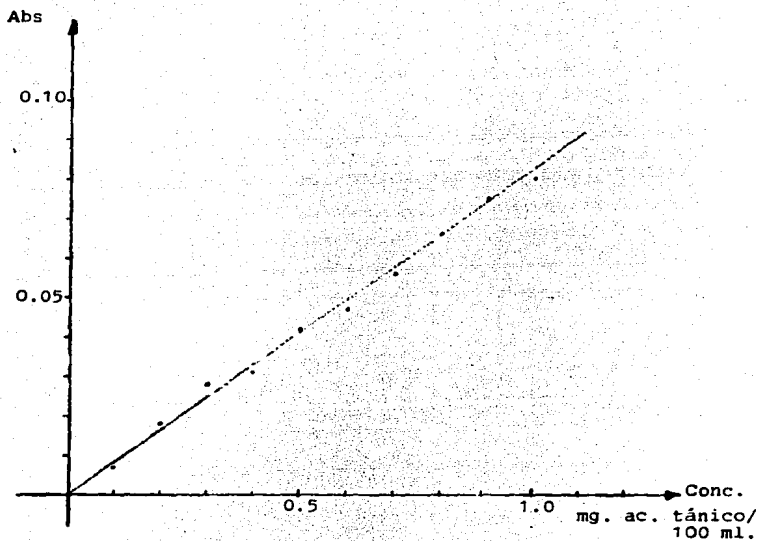
PREPARACION DE LA CURVA PATRON. (METODO FOLIN-DENIS).

- 1.- Colocar de 0.1 a 1.0 ml. de solución estandar de ácido tánico en matraces aforados de 100 ml. que contengan 75 ml. de agua destilada, agregar 5 ml. del reactivo de Folin-Denis y 10 ml. de la solución de carbonato de sodio.
- 2.- Aforar a la marca del matraz empleando agua destilada.
- 3.- Mezclar perfectamente y leer la absorbancia a 760 nm después de 30 minutos de reposo de los matraces.
- 4.- Graficar los valores de absorbancia contra la concentración de ácido tánico por 100 ml.
- 5.- Cuando se trabaja con las muestras, se coloca una alícuota de 1 ml. de las mismas en matraces aforados de 100 ml. -- conteniendo 75 ml. de agua destilada, agregar 5 ml. de -- reactivo Folin-Denis y 10 ml. de solución de carbonato de sodio, aforar con agua destilada y dejar en reposo durante 30 minutos. Leer la absorbancia a 760 nm y registrar los - valores obtenidos.
- 6.- Calcular el % de taninos en la muestra extrapolando los valores obtenidos sobre la curva patrón.

CURVA PATRON (METODO FOLIN-DENIS).

	VOL (ml)	ABSORBANCIA (760 nm)	CONC. (mg/ 100 ml.)
1.-	0.1	0.007	0.1
2.-	0.2	0.018	0.2
3.-	0.3	0.028	0.3
4.-	0.4	0.031	0.4
5.-	0.5	0.042	0.5
6.-	0.6	0.047	0.6
7.-	0.7	0.056	0.7
8.-	0.8	0.066	0.8
9.-	0.9	0.075	0.9
10.-	1.0	0.080	1.0

Curva Patrón para el
Método Folin-Denis
 $\lambda = 760 \text{ nm}$



TECNICA DE PORCIENTO DE RECUPERACION ANALITICA.

Debido a las diferentes fuentes de error que puedan introducirse en el desarrollo de los métodos, así como a la inespecificidad de los mismos, se pensó en una técnica de fácil manejo y ejecución que pudiera ser indicativo de la eficiencia -- real de los métodos aplicados. Así, una técnica sencilla, consiste en agregar una cantidad conocida de ácido tánico a las soluciones de trabajo que contienen los taninos extraídos y de los cuales se calculó previamente el porcentaje de taninos por cada uno de los tres métodos anteriores.

Una nueva evaluación por los tres métodos se lleva a cabo, ahora con la cantidad de ácido tánico adicionada. Teóricamente deberá resultar el valor de taninos de la muestra más el adicionado. Si estos datos se relacionan con el porcentaje esperado y el que ahora se obtenga, se puede conocer que recuperación -- ción (también con porcentaje) se tiene para cada método.

Los resultados del porcentaje de recuperación analítica para cada método se encuentran en el cuadro no. 1 de la sección de resultados.

ELIMINACION DE TANINOS.

Los procedimientos empleados para conseguir la eliminación de taninos en el grano de sorgo son dos:

- a) Tratamiento térmico.
- b) Tratamiento con diferentes concentraciones de alcali.

Estos tratamientos se trabajan por duplicado contra muestras de referencia de sorgo (al cual se ha determinado previamente el contenido de taninos aplicando el método FAS, (Sulfato - Férrico Amoniaco)).

a) Tratamiento Térmico.- Cinco gramos de muestra cuidadosamente seleccionada, se colocan en charolas de papel aluminio y se introducen a una estufa con termostato para regular la temperatura. Las muestras, en la estufa, se someten a diferentes temperaturas en tres intervalos de tiempo:

Tiempo de Calentamiento.	Temperaturas aplicadas.
10 minutos.	a 100, 120, 140, 160, 180 y 200° C.
20 minutos.	a 100, 120, 140, 160, 180 y 200° C.
30 minutos.	a 100, 120, 140, 160, 180 y 200° C.

Al concluir el tratamiento, se determina el porcentaje de taninos en las muestras, aplicando el método FAS (CUADRO 4).

b) Tratamiento con diferentes concentraciones de alcali.- En el siguiente método de eliminación, se hace uso de una solución alcalina en concentraciones variadas a diferentes tiempos de ebullición.

La cantidad de muestra sometida a experimentación en cada ensayo es de 5 g y también como en el método anterior, las muestras se trabajan contra una muestra de referencia a la que se ha determinado el contenido de taninos empleando el método FAS.

Las condiciones de trabajo en éste tratamiento son las siguientes:

Concentración solución alcalina.	Tiempo en ebullición
0.005 M	5 min; 10 min; 20 min.
0.010 M	5 min; 10 min; 20 min.
0.025 M	5 min; 10 min; 20 min.
0.050 M	5 min; 10 min; 20 min.

Para conocer la cantidad de taninos remanentes en el grano de sorgo, después de éste tratamiento, es necesario aplicar - el método de Sulfato Férrico Amoniacal. Se debe subrayar en éste punto que la determinación de taninos se lleva a cabo en líquido sobrenadante después de cada tratamiento. Así, el porcentaje obtenido en cada caso será el % eliminado para cada muestra. Estos resultados se encuentran en el Cuadro no. 6 de la sección de resultados.

ANALISIS QUIMICO PROXIMAL.

Un estudio de los parámetros más comunes en cuanto a elementos nutricionales en el grano del sorgo, se hace necesario para poder comparar el sorgo antes de cualquier tratamiento y después de los mismos.

Las muestras son preparadas para el análisis de la siguiente manera:

- 1.- Sorgo "normal".- El grano de sorgo seleccionado se muele finamente y se pesan diferentes fracciones para las determinaciones de: Humedad, cenizas, grasa, proteína cruda y fibra cruda, de acuerdo a los métodos oficiales de AOAC. (El análisis se lleva a cabo en base húmeda y por duplicado apareciendo el promedio de los resultado en el Cuadro no. 9).
- 2.- Sorgo tratado térmicamente.- Una muestra representativa de sorgo en grano se somete a un calentamiento de 20 mins. en una estufa a una temperatura de 140° C, - después de éste se permite enfriar a la muestra y entonces se muele finamente para pesar por duplicado -- muestra para las determinaciones del análisis proximal basadas en las técnicas del AOAC. (La muestra se trabaja en base húmeda, y los resultados para éste -- tratamiento en base seca y húmeda se concentran en el Cuadro no. 10)
- 3.- Sorgo tratado con solución alcalina (NaOH 0.05 M por 10 mins).- Una porción de grano de sorgo se coloca en un vaso de precipitado y se somete a ebullición durante 10 mins, después de agregarle 50 ml de NaOH - - 0.05 M, calentando sobre una parrilla. Al finalizar el tiempo se retira el vaso de la parrilla, se elimina el líquido sobrenadante y el grano tratado se lava con agua destilada para excluir cualquier exceso de -

solución alcalina, colocándolo posteriormente sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de agua. Se pesan de 3 a 5 g de sorgo en pesafiltros para determinar su humedad (Por duplicado).

Cuando el grano de sorgo se seca, se muele y entonces se trabaja la muestra en base seca para las determinaciones de cenizas, proteína cruda, extracto etéreo y fibra cruda. El promedio de los análisis realizados se encuentran en el Cuadro no. - 11.

R E S U L T A D O S

R E S U L T A D O S

Después de haber realizado las distintas técnicas para cuantificar taninos en sorgo y de haber sometido al mismo a -- dos tratamientos para eliminar estos compuestos, se obtuvieron los siguientes resultados agrupándolos en cuadros y tratándolos estadísticamente.

- CUADRO NO. 1 Contenido de taninos en muestras de sorgo aplicando tres métodos analíticos.
- a) Método de Lowenthal (Oxidación con $KMnO_4$)
 - b) Método de Sulfato Férrico Amoniacoal (FAS).
 - c) Método de Folin-Denis (reactivo alcalino -- fosfotungstato-fosfomolibdato).
- CUADRO NO.2 Resultados obtenidos por Análisis de Varianza - (ANOVA) al trabajar estadísticamente los datos de los métodos aplicados.
- CUADRO NO. 3 Resultados obtenidos para los diferentes métodos a distintos niveles de significancia por el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa -- (LSD).
- CUADRO NO. 4 Contenido de taninos en las muestras de sorgo -- después de su tratamiento a diferentes tiempos y temperaturas..
- CUADRO NO. 5 Resultados obtenidos del análisis de Varianza -- ANOVA) para las muestras de sorgo tratadas con calor.
- CUADRO NO. 6 Contenido de taninos en muestras de sorgo después de haber sido tratadas con diferentes concentraciones de solución de alcali y sometidas a diferentes tiempos de ebullición.
- CUADRO NO. 7 Análisis de Varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos del tratamiento de eliminación de taninos con alcali . (CUADRO 6).
- CUADRO NO. 8 Diferencia mínima significativa (LSD) para los resultados por ANOVA del tratamiento de eliminación de taninos con soluciones alcalinas.

CUADRO NO. 9 Resultados del Análisis Químico Proximal realizado al grano de sorgo antes de cualquier tratamiento.

CUADRO NO.10 Resultados del Análisis Químico Proximal del -- grano de sorgo después del tratamiento térmico (140°C durante 20 minutos).

CUADRO NO.11 Resultados del Análisis Químico Proximal del -- grano de sorgo después del tratamiento con solución alcalina (solución NaOH 0.05 M durante 10 minutos).

CUADRO NO. 1

Contenido de taninos en muestras de sorgo aplicando tres métodos analíticos.

MUESTRA	CONTENIDO DE TANINOS (%)		
	A	B	C
1	0.322	0.134	0.234
2	0.300	0.118	0.268
3	0.300	0.186	0.359
4	0.322	0.126	0.290
5	0.300	0.109	0.294
% de recuperación Analítica.	173%	76%	156%

Donde:

A= Método Lowenthal (Oxidación con KMnO_4)

B= Método del Sulfato Férrico Amoniacal (FAS)

C= Método de Folin-Denis (Reactivo Alcalino Fosfotungstato-Fosfomolibdato).

CUADRO NO. 2

Análisis de Varianza comparativo entre los tres métodos analíticos utilizados.

Hipótesis: Método A = Método B = Método C.

Para determinar si los métodos aplicados son iguales o diferentes estadísticamente, hablando, se realiza un análisis de varianza en base a la hipótesis planteada: las muestras provienen de una población "x", todas tienen la misma media aritmética, y la misma varianza, lo que implicaría una igualdad entre las medias de las muestras y por lo tanto una igualdad entre los métodos. Con el criterio de rechazar la hipótesis antes dicha, cuando la F calculada fuese mayor que la F teórica, se desarrolló el siguiente cuadro:

FV	SC	G.L.	C.M.	F.CALC.
Total	0.0972	14	--	---
Métodos	0.0845	2	0.04227	39.99 ***
Error	0.0126	12	0.00105	---

Donde:

FV= Fuente de Variación.

SC= Suma de Cuadrados.

GL= Grados de Libertad.

F.CALC.= Valor de F calculada.

Utilizando un criterio de rechazo a un nivel de significancia de 5%, se encuentra un valor para F teórica de:

$$F(2, 12) \text{ al } 5\% = 3.88$$

Como consecuencia se establece que el valor de F teórica es menor al de F calculada y que por lo tanto, existe una diferencia significativa entre los métodos en lo referente al contenido de taninos en las muestras.

CUADRO NO. 3

Diferencia Significativa (LSD) para
los métodos de cuantificación a
diferentes niveles de significancia.

El procedimiento empleado para determinar cual o cuales métodos son significativamente diferentes es el de la diferencia mínima significativa (Last Significance Difference) mediante la fórmula:

$$LSD = t_{\alpha} \sqrt{2 v/n}$$

Donde:

LSD = Diferencia mínima significativa.

t = Valor t con grados de libertad de error
al nivel de significancia 0.05.

v = Cuadrado medio del error.

n = Número de resultados en cada método.

Diferencia entre métodos A y B = 0.172

Diferencia entre métodos B y C = 0.143

Diferencia entre métodos A y C = 0.029

Como $LSD_{5\%} = 0.04476$

Significa que entre los métodos A y C no hay diferencia significativa, mientras que B es diferente a A y, a C.

CUADRO NO. 4

Contenido de Taninos en muestras de Sorgo
después de su tratamiento a diferentes
tiempos y temperaturas.

Tiempo de calentamiento	Temperatura aplicada.					
	100°C	120°C	140°C	160°C	180°C	200°C
	% T A N I N O S .*					
10 min	0.082	0.087	0.061	0.064	0.069	0.050
20 min	0.079	0.067	0.048	0.056	0.065	0.075
30 min	0.054	0.051	0.058	0.055	0.076	0.069

* La cuantificación de taninos se hace por el método FAS (Sulfa-
to Férrico Amoniacal).

CUADRO NO. 5

Resultados de Varianza (ANOVA)
para las muestras de sorgo tratadas térmicamente.

FV	SC	GL	CM	F CALC.	F TEOR 5%
Total	0.00233	17	- -	- - -	- - - - -
Temp.	0.00063	5	0.000126	0.8873	3.11
Error	0.00170	12	0.000142	- - -	- - - - -

Donde:

FV = Fuente de Variación.

SC = Suma de Cuadrados.

GL = Grados de Libertad.

CM = Cuadrado Medio.

F.Calc. = Valor de F calculada.

F.teor 5% = Valor de F. teórica al 5% de significancia.

Estableciendo la hipótesis: tratamiento 1=2=3=4=5=6 y con el criterio de rechazar la hipótesis cuando el valor de F calculada fuese mayor que la F teórica, se encuentra que no hay diferencia significativa a un nivel de 5% para ninguno de los tratamientos a diferentes temperaturas, pudiendo emplear éstos, indistintamente cuando se desee.

CUADRO NO. 6

Contenido de taninos en muestras de sorgo después de haber sido tratadas con diferentes concentraciones de solución de álcali y sometidas a diferentes tiempos de ebullición.

Tiempo de ebullición	CONCENTRACION DE ALCALI.			
	0.005M	0.01 M	0.025M	0.05M
	% T A N I N O S .			
5 minutos.	0.054	0.075	0.074	0.083
10 minutos.	0.062	0.077	0.076	0.090
20 minutos.	0.062	0.078	0.077	0.089

* Cuantificación de taninos por el método FAS.

Nota: Es importante hacer notar que la lectura de absorbancia para la determinación de taninos, se hace en el líquido sobrenadante del sorgo después de que éste ha sido tratado, lo que indica que la diferencia en porcentaje tomando como base 0.109% de taninos totales es la cantidad remanente de taninos en el grano de sorgo.

CUADRO NO. 7

Análisis de Varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos del tratamiento de eliminación de taninos con álcali.

FV	SC	G.L	CM	F CALC.	F TEOR 5%
Total	0.00129	11	- -	- - - -	- - - -
Concentra ciones.	0.00118	3	0.00039	28.68	4.07
Error	0.00011	8	0.000013	- - -	- - - -

Donde:

FV = Fuente de Variación.

SC = Suma de cuadros.

GL = Grados de libertad.

CM = Cuadrado Medio.

F Calc. = Valor de F calculado

F teor. 5% = Valor de F teórica a un nivel de significancia de 0.05

Dado que el valor de F calculada es mayor que el de la F teórica, se rechaza la hipótesis de que no hay diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de álcali usadas.

CUADRO NO. 8

Diferencia mínima significativa (LSD) para los resultados por ANOVA del tratamiento de eliminación de taninos con soluciones alcalinas.

Diferencia entre concentraciones	0.005 y 0.010 M = 0.018
Diferencia entre concentraciones	0.005 y 0.025 M = 0.017
Diferencia entre concentraciones	0.005 y 0.050 M = 0.028
Diferencia entre concentraciones	0.01 y 0.025 M = 0.001
Diferencia entre concentraciones	0.01 y 0.050 M = 0.010
Diferencia entre concentraciones	0.025 y 0.050 M = 0.011

La diferencia mínima significativa $LSD = t_{\alpha} \sqrt{2 v/n}$
a 5% = 0.00696.

Lo anterior indica que entre las concentraciones de 0.01 M y 0.025 M no hay diferencia significativa, mientras que entre las demás concentraciones, si la hay.

CUADRO NO. 9

Resultados del análisis químico proximal
para el grano de sorgo.

	BASE HUMEDA	BASE SECA
MATERIA SECA	89.64%	100.00%
HUMEDAD	10.36%	- - - -
CENIZAS	1.58%	1.76%
PROTEINA (Nx6.25)	8.71%	9.72%
EXTRACTO ETHEREO	3.42%	3.81%
FIBRA CRUDA	1.77%	1.97%
CARBOHIDRATOS	74.16%	82.74%

CUADRO NO 10

Resultados del análisis químico proximal del grano
de sorgo después del tratamiento térmico
(140° C durante 20 minutos)

	BASE HUMEDA	BASE SECA
MATERIA SECA	95.51%	100.00%
HUMEDAD	4.49%	- - - -
CENIZAS	1.66%	1.74%
PROTEINA (Nx6.25)	9.09%	9.52%
EXTRACTO ETereo	4.08%	4.27%
FIBRA CRUDA	1.98%	2.07%
CARBOHIDRATOS	78.70%	82.40%

CUADRO NO 11

Resultados del análisis químico proximal del grano
de sorgo después del tratamiento con solución
alcalina. (NaOH 0.05 M durante 10 min.)

	BASE HUMEDA	BASE SECA
MATERIA SECA	79.65%	100.00 %
HUMEDAD	20.35%	- - - -
CENIZAS	1.35%	1.69%
PROTEINAS (Nx6.25)	6.43%	8.08%
EXTRACTO ETereo	0.45%	0.56%
FIBRA CRUDA	1.91%	2.41%
CARBOHIDRATOS	69.51%	87.26%

DISCUSION.

Al término del desarrollo de éste trabajo se encuentra que el grano de sorgo invariablemente contiene taninos. La proporción encontrada de éstos se considera baja en relación a las especies estudiadas por Chavan, J.K. et al (1979) quienes encontraron valores hasta de un 3.44% de taninos. (7).

Sin embargo, el estudio realizado demuestra que las especies de sorgo utilizadas en México, contienen taninos en cantidades variables y que analíticamente se pueden determinar cuantitativamente por varios métodos (24). Métodos que de acuerdo a su variación, fundamento teórico, reproducibilidad y porcentaje de recuperación dieron la pauta para la elección del más confiable y manejable como herramienta rutinaria de análisis (Cuadro no. 1). Esta técnica de análisis resultó ser la del Sulfato Férrico Amoniacal, en primer término por tener un porcentaje de recuperación más aceptable (en relación a los otros dos métodos usados), en segundo término, por ser un método de fácil desarrollo y porque la coloración obtenida es específica para los compuestos fenólicos y de ésta forma evitar interferencias significativas, paralelamente esta característica no se presenta en los otros dos métodos y se sugiere sea la razón del porqué el porcentaje de recuperación es menor que en aquellos.

Se ha comprobado que en el método FAS la relación entre la concentración y la extinción (en el espectrofotómetro) se encuentra lineal para el rango de 25-150 mg. de taninos por litro (24). En los resultados obtenidos para las muestras trabajadas por éste método (Cuadro no. 1), la concentración que corresponde al promedio en porcentaje de 0.136 es de 36 mg de taninos/litro, éste valor está dentro del rango de linealidad, así como la mayoría de los valores obtenidos en FAS.

El método de Folin-Denis, así como el de oxidación con KMnO_4 (de Lowenthal) presentan poca especificidad para los compuestos fenólicos, puesto que estan cuantificando material " no - tanino " como si en realidad lo fuera.

Además, la técnica de Folin-Denis presenta interferencias no torias como son: la posible precipitación de complejos de sodio, la interferencia por ácidos o bien el hecho de que el reactivo de ácido fosfotungstomolibdico sea reducido por otros compuestos, -- produciendo algun color que pueda interferir y/o intensificar el color azul que se obtiene de los complejos. Estas interferencias pueden hacer variar al resultado y ello explica el porqué de los altos porcentajes de recuperación obtenidos. (Cuadro no. 1).

Otro aspecto desventajoso del método Folin-Denis es que la - técnica es tediosa y prolongada aún desde la preparación de los reactivos (que además de costosos son difíciles de conseguir), y el rango de cuantificación oscila entre 0.1 mg y 1.0 mg de ácido tánico/100 ml. Por ello se sugiere que éste método no es muy reco mendable para usarse como cotidiano.

En cuanto al método de oxidación con KMnO_4 , (Lowenthal) és te puede ser considerado como rápido y sencillo, sin embargo, -- muestra como inconvenientes principales la oxidación de otros com puestos, la precipitación variable y no cuantitativa, además de - la no oxidación de derivados de taninos (24). Todo lo anterior- hace que el método deje mucho que desear y tampoco sea considera- do como adecuado, esto se corrobora con el alto porcentaje de re cuperación lo cual indica la oxidación de otras sustancias aparte de los taninos.

Por las razones anteriores, puede estimarse el porqué se ha escogido el método FAS (Sulfato Férrico Amoniactal) como rutina ri o para cuantificar los niveles de taninos después de aplicar - los tratamientos para la eliminación de los mismos.

La base para establecer los procedimientos para la eliminación de taninos es la confirmación de que éstos pueden degradarse empleando ciertas temperaturas durante un determinado tiempo, y - el hecho de que las soluciones alcalinas también causan la remoción de los taninos.

Con respecto a la eliminación de taninos empleando diferentes temperaturas (Cuadro No. 4) puede decirse a groso modo y - de acuerdo a los valores obtenidos en promedio, que la temperatura que responde mejor a la eliminación de taninos es de 140°C -- por 20 minutos ya que la cuantificación después del tratamiento - es de 0.048% lo que representaría aproximadamente un 55.96% de -- eliminación del total cuantificado al inicio del tratamiento - -- (0,109%).

Dado que los resultados obtenidos por este método de eliminación son semejantes, se llevó a cabo un análisis de varianza - -- (Cuadro No. 5) para conocer estadísticamente y con seguridad si hay diferencia entre las temperaturas empleadas y al mismo tiempo si es que la hay entre los tiempos de calentamiento.

El cuadro de ANOVA para tratamiento térmico muestra que no hay diferencia significativa a un nivel de 5% de manera que la - elección del tratamiento puede ser indistinta. Sin embargo, es -- obvio pensar que la reducción en tiempo y costo hará que se elija aquel que en menor tiempo y temperatura garantice la mayor eliminación de taninos, (puede hablarse nuevamente del tratamiento a 140°C por 20 minutos).

Como alternativa de eliminación de taninos y con base a que las soluciones alcalinas también producen una remoción de los -- mismos, el siguiente método empleó soluciones ligeramente alcalinas con concentraciones que van desde 0.005 M, 0.001 M, 0.025 M hasta 0.05 M como la más concentrada, aplicando tiempos de extracción de 5, 10 y 20 minutos.

Los resultados de este tratamiento (Cuadro no. 6) demuestran que en el caso de la extracción básica el tratamiento con solución 0.05 M por 10 minutos es el que rinde la mayor remoción de taninos en el grano de sorgo.

De manera semejante que en el método térmico, los resultados obtenidos se someten a estudio estadístico por análisis de varianza para conocer si existen diferencias significativas entre los tratamientos alcalinos. (Cuadro no. 7).

El análisis muestra un F calculada a un nivel de significancia de 5% mayor que F teórica, lo que indica: diferencia significativa entre los tratamientos. La aplicación de la ecuación para conocer la diferencia mínima significativa (Cuadro no. 8) de -- muestra que entre las concentraciones 0.01 M y 0.025 M no hay diferencias significativa mientras que si la hay entre las concentraciones 0.005 M y 0.05 M. Este dato lleva a definir que la concentración de NaOH 0.05 M es diferente significativamente a las de -- más concentraciones y por otra parte la que elimina la mayor cantidad de taninos. (Atendiendo a una concentración de 0.109% de taninos encontrado en la muestra de sorgo, antes de la aplicación de los métodos para eliminación de taninos, y considerando ésta -- como un 100%, se estará entonces eliminando aproximadamente un -- 82.57% de taninos al emplear el método alcalino.)

No podrían hacerse a un lado las consideraciones nutricionales del grano de sorgo tratado, pues, por ejemplo si uno de los -- problemas que causan los taninos es la indisponibilidad de proteí -- nas, pudiera ser que éstas proteínas se afecten aún más con los -- tratamientos que se han dado. Es entonces importante verificar -- por medio de análisis químico proximales el grado de afectación -- (si es que la hay) en el grano tratado. Para lo anterior se estudian factores como: % proteínas, % humedad, % cenizas, % grasa, % fibra cruda y % carbohidratos; antes de someter al sorgo a ex -- perimentación (Cuadro no. 9) y después de tratamiento térmico -- (Cuadro no. 10) así como, del tratamiento alcalino(Cuadro no. 11).

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio se encontró que los métodos aplicados para determinar el contenido de taninos en la semilla de sorgo, son diferentes significativamente.
- 2.- El estudio estadístico de los resultados obtenidos y la determinación del porcentaje de recuperación en los diferentes métodos aplicados para taninos, pone de manifiesto que el método del Sulfato Férrico Amónico (FAS), por sus cualidades analíticas se considera como método más adecuado para usarse rutinariamente .
- 3.- Las muestras de sorgo empleadas en los métodos de eliminación de taninos, tuvieron como valor más alto de taninos un 0.109%. (Este valor es tomado como referencia para conocer o determinar el porcentaje de eliminación de taninos en el sorgo).
- 4.- El método para eliminación de taninos térmicamente, eliminó - hasta un 55.96% . (Siendo la mejor temperatura la de 140°C - por un tiempo de 20 minutos.)
- 5.- El método para la eliminación de taninos empleando concentraciones variadas de álcali, elimina hasta un 82.57% de taninos aplicando la solución de NaOH a una concentración de 0.05 M.
- 6.- El estudio químico proximal para verificar el grado de afectación de la semilla de sorgo después de aplicar los diferentes métodos de eliminación muestra que:

- a) La mayoría de los parámetros del análisis químico proximal en el sorgo tratado térmicamente no son afectados considerablemente, sobre todo si se compara el porcentaje de proteínas en base seca, el cual sólo disminuye en cifras decimales.
- b) Un grado de afectación mayor se observa en el tratamiento alcalino donde la proteína disminuye hasta en un 1.6% y la grasa decrece significativamente (-3.25%).
- c) Por lo anterior y en base a factores nutricionales, de manejo, de costo y de tiempo; se sugiere el empleo del método térmico cuando se desee conseguir una eliminación aunque sea parcial, de los taninos presentes en el sorgo.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- A. AMERINE, MAYNARD; B. ROESSLER: Wines, Their sensory evaluation University of California, Davis, USA -- pag. 136- 154 (1976).
- 2.- A.O.A.C. Official Methods of Analysis. Ass. Offic. Agric. Chem. 2nd. Ed. Washington (1975).
- 3.- BATE-SMITH, E.C. & N.H. LERNER.: Leuco-anthocyanins 2. Systematic distribution of leuco-anthocyanins in leaves. Biochem J. 58. 126-129 (1954).
- 4.- CEJUDO, J.H.E. Estudio de metodologías físicas, determinación de taninos y actividad de la enzima catecol oxidasa en granos de sorgo. Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de Chapingo. México -- (1978).
- 5.- CORREA, V.H. Sorgo de los Estados Unidos en la alimentación del ganado. Grain Sorghum Producers Association Traducción del Inglés. Torreón Coah. México. -- (1980).
- 6.- CHANG, S.I. and FULLER H.L. Effect of tannin content of grain sorghums on their feeding value for growing chicks. Poult. sci. 43:30-36 (1964).
- 7.- CHAVAN J.K., KADAM S.S. GHONSIKAR, C.P. and SALUNKHE, D.K. -- Removal of tannins and improvement of in vitro protein digestibility of sorghum seeds by soaking in alkali. J. Food sci 44:1319 (1979).
- 8.- CHAVAN, J.K. KADAM, S.S., and SALUNKHE, D.K. Changes in tannin free amino acids, reducing sugars and starch during seed germination of low and high tannin cultivars of sorghum. J. Food. sci 46 -- 638-639 (1981).
- 9.- DIAZ, P.C.I. Manual de Gramíneas. División de ciencias Biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México D.F. (1976).
- 10.- EGUIARTE, V. J.A. Determinación de la energía metabolizable y del valor nutritivo de 5 variedades híbridas de sorgo en pollos de engorda. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. México (1976).

- 11.- ESAU, K. Anatomía Vegetal. Traducción del Inglés por J. Pons Rosell. Barcelona. Omega pag. 779 (1972)
- 12.- FREUDENBERG, K. y K. WEINGES. The chemistry of flavonoid - compounds. Geissman T.A. Pergamon Press, Oxford England (1962).
- 13.- HATHWAY, D.E. Wood Extractives. Hillis W.E. Academic Press N.Y.
- 14.- HERGERT, H.L. The chemistry of flavonoid compounds Geissman T.A. Pergamon Press. Oxford England (1962).
- 15.- JAMBUNATHAN, R. and MERTZ, E.T. Relationship between tan - nin levels, rat growth and distribution of pro - teins in sorghum. J. Agric. Food. Chem 21;692 - (1973).
- 16.- LEON, N.A. La industria Tanífera de México. Escuela Nacio - nal de Economía. Tesis de Licenciatura Universi - dad Nacional Autónoma de México (1965).
- 17.- LOOMIS, W.D. & J. BATTLE. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochem 5. -- pags. 423-438 (1966).
- 18.- PRO, M.A. y E. SOSA, M. Estudios de los sorgos altos en tan - inos en dietas para pollos de engorda en ini - ciación. V Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura, Colegio de Post-graduados. -- Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias P. 17-24- México D.F. (1980).
- 19.- PRO, M.A. y E. SOSA, M. Características nutricionales de sorgos con diferente contenido de taninos. VI Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avi - cultura. Colegio de Post-graduados. Instituto Nacional de investigaciones pecuarias. pag. 82 México D.F. (1982).
- 20.- PURDUE, UNIVERSITY, LAFFAYETTE. Indiana U.S.A. Agricultu - ral Department Chemical and Biochemical methods for sorghum grain (1978).
- 21.- RIVEREAU GAYON, P. Plant Phenolics. Traducción del francés por V.H. Heywood. University review in Botany - Oliver & Boyd. Edinburgh 254 p. (1968).

- 22.- ROONEY, L.W. Utilization of Sorghum grain: food and industrial Grain sorghum research in Texas. The Texas Agricultural Experiment station (1970).
- 23.- ROSS, W.M y WEBSTER, O.J. Cultivo y Utilización del sorgo Centro Regional de Ayuda Técnica/ Agencia para el desarrollo internacional (AID) México D.F. (1967).
- 24.- SHANDERL, S.H. Tannins and Related phenolics. Rein Hold -- Book Corporation N.Y. (1968).
- 25.- SOYA-NOTICIAS. (Publicación) Asociación Americana de Soya Abril/Mayo. 1986 Año XV nos. 186 y 187 fuente: Avicultura Profesional Vol. 3 (1985).
- 26.- STRUMEYER, DAVID, H. and MICHAEL J. MALIN: Condensed tannins in grain sorghum. Isolation, fractionation characterization. J. Agric. Food. Chem Vol. 23, 909 (1975).
- 27.-SUAREZ, F.J.A. Estudio comparativo entre variedades de sorgo con diferentes contenidos de taninos en dietas para pollos. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. México (1977).
- 28.- SWAIN, T. y BATE- SMITH E.C.The tannins. Comparative Biochemistry. III A.M. Florking y H.S. Mason. Academic Press, N.Y. (1977)
- 29.- SWAIN, T y J.L GOLDSTEIN Methods in polyphenols chemistry J.B. Pridham. Pergamon Press, Oxford, England. (1972).