

Métodos de conservación de muestras de forraje de leguminosas tropicales y su efecto en el nivel y en la actividad biológica de los taninos*

R. Cano*, J. Carulla** y C. E. Lascano***

Introducción

En América tropical se ha dado énfasis a la evaluación de leguminosas arbustivas como *Leucaena*, *Gliricidia* y *Erithrina*, que crecen bien en suelos de moderada acidez con bajos niveles de aluminio intercambiable (Perdomo, 1991). Debido a la importancia de la ganadería en áreas tropicales con suelos ácidos de baja fertilidad, se considera importante seleccionar leguminosas arbustivas que se adapten a estas condiciones. El Programa de Forrajes Tropicales del CIAT ha identificado leguminosas arbustivas promisorias para suelos ácidos con altos niveles de aluminio (Perdomo, 1991). Sin embargo, algunas de estas especies contienen taninos, lo que puede limitar su uso como plantas forrajeras. Es necesario, en consecuencia, determinar qué tanta variabilidad existe en el contenido de taninos de las especies con mejor comportamiento agronómico.

Para evaluar y seleccionar leguminosas forrajeras tropicales con base en el contenido de taninos, es necesario emplear métodos de

conservación de muestras, que alteren lo menos posible el nivel y la actividad biológica de los taninos presentes en el tejido vegetal. Los estudios realizados con leguminosas de zonas con clima templado, muestran que el método de secado de las muestras afecta el nivel de taninos condensados extractables (TCE). Muestras liofilizadas de *Lespedeza cuneata* presentaron mayor nivel de taninos extractables que muestras secadas en horno (Terrill et al., 1990). La reducción del nivel de taninos de las muestras secadas en horno puede deberse a que el calor induce la polimerización de los taninos, o a que éstos forman complejos con la proteína y la fibra de la planta (Terrill et al., 1990 y 1992).

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de varios métodos de conservación de muestras de leguminosas tropicales en el nivel, grado de polimerización y distribución de taninos en el tejido vegetal y en la capacidad de éstos para reaccionar con proteína.

Materiales y métodos

Para estudiar el efecto de los métodos de conservación de las muestras de tejido en el contenido con taninos, se utilizaron leguminosas arbustivas: *Calliandra* spp., *Flemingia macrophylla*, *Phyllodium* spp. y *Tadehagi* spp., y una leguminosa tipo enredadera: *Dioclea guianensis*. Para estudiar el efecto del método de secado en distribución de taninos en el tejido

* Resumen del trabajo de grado presentado por la autora principal para obtener el título de Zootecnista, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias de Palmira, Palmira, Colombia.

** Nutricionista Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.

*** Jefe del área de Calidad y Nutrición de Rumiantes, Programa de Forrajes Tropicales del CIAT, Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia.

se incluyó *Desmodium ovalifolium*. Las leguminosas, con edad de rebrote variable, se cosecharon en la estación CIAT Quilichao, durante la época de mínima precipitación.

Después de la cosecha, el forraje se separó en hojas y tallos; posteriormente, dos submuestras de hojas frescas de cada leguminosa se sometieron a los tratamientos siguientes:

T1: Hojas frescas y congeladas (muestras congeladas que se maceraron en presencia de nitrógeno líquido al momento de realizar los análisis de taninos).

T2: Hojas secadas por liofilización, a las cuales se les extrajo humedad al vacío.

T3: Hojas secadas en horno por 48 horas a una temperatura de 60 °C.

Las muestras secas (liofilización y horno) se molieron con una malla de 1 mm y se empacaron en bolsas plásticas para los análisis de nivel y actividad biológica de los taninos. Los métodos utilizados para el análisis de los taninos se describen a continuación.

Análisis de taninos extractables. Para determinar el nivel de taninos condensados extractables (TCE) en las leguminosas se empleó el método de n-Butanol-HCl (Porter et al., 1986). La extracción de taninos se hizo con una solución acuosa de metanol (70%), con ácido fórmico (0.5%) y con ácido ascórbico (0.05%). El nivel de taninos extractables de cada leguminosa se calculó con base en un estándar de taninos purificados. La purificación de los taninos se basó en el método de Asquith and Buttler (1985), modificada por Hagerman (sin publicar) para taninos de Quebracho. Inicialmente se extrajeron taninos de las leguminosas liofilizadas con la solución acuosa de metanol (70%) utilizada en análisis previos. Este extracto de taninos se disolvió con etanol (50%) y la solución se centrifugó. La fracción sobrenadante se mezcló con Sephadex LH-20 y se lavó con etanol (96%) hasta obtener un color claro en la primera fracción, y oscuro en el Sephadex. Este último se lavó con acetona (50%) y el sobrenadante se recuperó por filtración. Después de sucesivos lavados con éter dietílico, la solución acuosa (i.e., taninos purificados), una vez congelada y liofilizada, se conservó en un desecador dentro de un congelador.

Distribución de taninos en el tejido vegetal.

La distribución de los taninos en el tejido vegetal en muestras de leguminosa secadas en horno y liofilizadas se determinó con el método de Terrill et al. (1992). Con este método se midió la proporción de TCE y de taninos ligados a la proteína y a la fibra de la planta. El procedimiento modificado involucró la extracción en una primera etapa de taninos libres con una solución acuosa de metanol (70%), ácido fórmico (0.5%) y ácido ascórbico (0.05%). Para solubilizar la proteína ligada a taninos, al residuo de esta extracción se le adicionó una solución de sodio dodecil sulfato (SDS) (1%) y mercoptoetanol (5%). Para medir los taninos ligados a la fibra, el residuo resultante se sometió a ebullición con Butanol-HCl y SDS. Por último, los taninos de cada leguminosa se purificaron para preparar soluciones estándar en solución acuosa de metanol que se usaron para medir los TCE, y en SDS para medir los taninos ligados a la proteína y a la fibra.

Actividad biológica de los taninos. Para medir el efecto de los métodos de conservación en la actividad biológica de los taninos condensados de cada una de las leguminosas, se utilizó el método de difusión radial de Hagerman (1987), modificado por Lareo et al. (1990). Con este método fue posible medir la capacidad de los TCE para precipitar la proteína de origen animal (BSA).

Polimerización relativa de taninos. El grado de polimerización relativa de los taninos condensados en las hojas de las leguminosas sometidas a diferentes tratamientos de conservación, se determinó con un método desarrollado en el CIAT por Lareo (Lareo, comunicación personal). Con este método se determina la relación entre la pendiente de una curva estándar de taninos purificados de la leguminosa en estudio y la pendiente de la curva estándar de un monómero (catequinas). El grado de polimerización relativo (GPR) de los taninos de las leguminosas se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{GPR} = \frac{\text{Pendiente de la curva estándar de los taninos de la muestra}}{\text{Pendiente de la curva del monómero (catequina)}}$$

Análisis estadístico. Los resultados de la determinación de los taninos se sometieron a un análisis de varianza, utilizando la especie de leguminosa, el método de conservación y su correspondiente interacción como fuentes de variación.

Resultados y discusión

Nivel de taninos condensados extractables.

Los resultados mostraron que el nivel de TCE varió en forma significativa ($P < 0.01$), debido al método de conservación de las muestras y a la especie de leguminosa (Cuadro 1). Las muestras de leguminosa liofilizadas presentaron el mayor contenido de TCE ($P < 0.05$), seguido por las muestras secadas en horno y las muestras frescas en congelación. A pesar de que se encontró una interacción significativa de la especie de leguminosa con el método de conservación, *Phyllodium* spp. presentó el mayor nivel de TCE y *Calliandra* spp. el menor, en forma independiente del método de conservación empleado.

En estudios con leguminosas tropicales (Ahn et al., 1989) y con leguminosas de climas templados (Terrill et al., 1990) se encontró que el nivel de TCE fue mayor en muestras liofilizadas que en muestras secadas en horno. Terrill et al. (1990) también encontraron en *Lespedeza cuneata* que el nivel de TCE fue mayor en

muestras liofilizadas que en muestras frescas congeladas, independiente del nivel de taninos en la planta. La manipulación de muestras congeladas conlleva a la formación de un medio acuoso, ideal para la formación de complejos de taninos con proteína y fibra (Terrill et al., 1990). Es posible que en el presente estudio la maceración de las muestras congeladas, aun en presencia de nitrógeno líquido, favoreció la liberación de taninos, los cuales a su vez reaccionaron con proteínas y fibra de la planta.

Actividad biológica de los taninos. La actividad biológica más importante de los taninos es su astringencia o capacidad de precipitar proteína. Los resultados de la actividad biológica de los taninos de leguminosas sometidas a diferentes métodos de conservación se presentan en el Cuadro 2. La reactividad de los TCE con proteína animal (BSA/100 g de MS) fue mayor ($P < 0.05$) en muestras liofilizadas que en muestras secadas en horno y que en muestras frescas congeladas. El ordenamiento de las leguminosas en función de la capacidad de los taninos de precipitar proteína, fue diferente con los tres métodos de conservación de muestras. Sin embargo, los TCE de *Calliandra* spp., *D.*

Cuadro 1. Efecto del método de conservación de muestras de hojas frescas de leguminosas en el porcentaje de taninos condensados extractables (TCE)*.

Leguminosas (No. CIAT)	Método de conservación		
	Congelada (TCE, %)	Liofilizada (TCE, %)	Secada en horno (TCE, %)
<i>Calliandra</i> spp. (20401)	4.2	10.9	7.9
<i>Dioclea guianensis</i> (19391)	10.9	16.0	15.4
<i>Flemingia macrophylla</i> (17403)	10.8	16.7	12.5
<i>Phyllodium</i> spp. (23998)	19.2	22.2	19.5
<i>Tadehagi</i> spp. (13269-274)	16.4	18.4	12.2
Promedio	12.3 c**	16.8 a	13.5 b
E.S.M. = 0.14			

La interacción leguminosa x método de conservación ($P < 0.0001$).

* Determinado por el método de Butanol-HCl (Porter et al., 1986).

** Promedios en una misma fila seguidos por letras iguales no difieren entre sí ($P < 0.05$), según la prueba de Duncan.

Cuadro 2. Efecto del método de conservación de hojas frescas de leguminosas en la capacidad de los taninos condensados extractables para precipitar proteína de origen animal.

Leguminosas (No. CIAT)	Método de conservación		
	Congelada	Liofilizada	Secada en horno
(Proteína precipitada (g/100 g de MS))*			
<i>Calliandra</i> spp. (20401)	21.8	42.2	38.8
<i>Dioclea guianensis</i> (19391)	24.2	29.2	27.5
<i>Flemingia macrophylla</i> (17403)	6.9	10.2	7.7
<i>Phyllodium</i> spp. (23998)	12.4	16.7	11.3
<i>Tadehagi</i> spp. (13269-274)	21.8	34.8	21.3
Promedio	17.4 c**	26.4 a	21.3 b
E.S.M. = 0.23			

La interacción leguminosa x método de conservación fue significativa ($P < 0.0001$).

* Determinada por el método de difusión radial de Hagerman (1987).

** Promedios en una misma fila seguidos por letras iguales no difieren entre sí ($P < 0.05$), según la prueba de Duncan.

guianensis y *Tadehagi* spp. precipitaron más proteína que los TCE de *F. macrophylla* y *Phyllodium* spp.

Cuando los resultados de la actividad biológica de los taninos de las leguminosas se expresaron como proteína precipitada/g de tanino, se encontró que no hubo efecto ($P > 0.05$), debido al método de conservación, siendo el promedio a través de las leguminosas y de los métodos de conservación de 1.8 g de proteína ligada/g de tanino. Sin embargo, fue evidente que los taninos de *Calliandra* spp. fueron más reactivos con proteína (4 a 5 g de proteína ligada/g de tanino) que los taninos de *F. macrophylla* y *Phyllodium* spp. (0.6 g de proteína ligada/g de tanino). La mayor afinidad de los taninos de *Calliandra* spp. con proteína (BSA) pudo deberse a la presencia en esta leguminosa de taninos hidrolizables y condensados (Cano, 1993).

Polimerización relativa de taninos. La polimerización relativa de los taninos de las leguminosas varió como consecuencia del método de conservación de las muestras y de la especie de leguminosa (Cuadro 3). Las leguminosas liofilizadas y las secadas en horno presentaron taninos con mayor ($P < 0.05$) grado de polimerización que las leguminosas frescas congeladas. Si bien el orden de las leguminosas en función del grado de polimerización fue diferente con los tres métodos de conservación, los taninos de *F. macrophylla* y *Phyllodium* spp. presentaron el mayor grado de polimerización y

los de *Calliandra* spp. y *D. guianensis* el menor grado de polimerización, independiente del método de conservación empleado. Goldstein and Swain (1963) observaron que el grado de polimerización de taninos condensados aumentó cuando el tejido de algunas frutas se secó en horno, lo cual no se observó en el presente trabajo.

La actividad biológica de los taninos condensados (gramos de BSA precipitada/100 g de MS) en las leguminosas evaluadas no se relacionó con el nivel de TCE, pero sí con el grado de polimerización relativa de los taninos ($r = -0.77$; $P < 0.001$). El análisis de los resultados mostró una alta actividad biológica de los taninos cuando el grado de polimerización fue de 4 unidades de monómero, como ocurrió con *Calliandra* spp., pero cuando el grado de polimerización relativa alcanzó entre 8 y 9 unidades de monómero, como en *Phyllodium* y *F. macrophylla*, la reactividad de los taninos con proteína disminuyó. Oh and Hoff (1979) encontraron que la reactividad de los taninos de uva con proteína aumentó cuando el grado de polimerización varió entre 3 y 8 unidades de monómeros. Sin embargo, cuando el grado de polimerización fue mayor a 8 unidades de monómeros, la reactividad de los taninos disminuyó.

En general, los resultados de este estudio sugieren que en la evaluación de la calidad nutritiva de especies de leguminosas tropicales es necesario medir tanto el nivel como el tipo de tanino presente.

Distribución de los taninos en el tejido vegetal. En la primera fase de este estudio se encontró que el nivel de TCE era mayor en las muestras de las leguminosas liofilizadas que en leguminosas secadas en horno (Cuadro 2). Esta diferencia no se asoció con los cambios en la polimerización de los taninos por el secado con temperatura. Por lo tanto, fue de interés investigar si el secado con calor producía cambios en la distribución de los taninos en el tejido de las leguminosas evaluadas. Para tal efecto, se utilizó la metodología recientemente desarrollada por Terrill et al. (1992). En todas las leguminosas incluidas en esta prueba se encontró de nuevo que el nivel de TCE fue mayor ($P < 0.05$) en las muestras liofilizadas que en las muestras secadas en horno. Sin embargo, la disminución en el contenido de taninos extractables en las muestras secadas en horno

Cuadro 3. Efecto de método de conservación de muestras de hojas de leguminosas en el grado de polimerización relativa de taninos (PRT).

Leguminosas (No. CIAT)	Método de conservación		
	Congelada	Liofilización	Horno
	(Grado de polimerización relativa)*		
<i>Calliandra</i> spp. (20401)	3.7	4.5	4.6
<i>Dioclea guianensis</i> (19391)	5.4	4.3	4.2
<i>Flemingia macrophylla</i> (17403)	8.7	9.2	9.8
<i>Phyllodium</i> spp. (23998)	6.8	9.5	9.2
<i>Tadehagi</i> spp. (13269-274)	6.7	6.5	7.2
Promedio	6.2 b**	6.8 a	7.0 a
E.S.M. = 0.12			

La interacción leguminosa x método de conservación fue significativa ($P < 0.0001$).

* Grado de polimerización relativa a un monómero (catequina).

** Promedios en una misma fila seguidos por letras iguales no difieren entre sí ($P < 0.05$), según la prueba de Duncan.

se compensó por un incremento en los taninos ligados a la proteína y, en menor grado, a la fibra de la planta. Como resultado, los taninos totales no cambiaron ($P > 0.05$) debido al método de secado en las leguminosas evaluadas (Cuadro 4).

El 79% de los taninos en las leguminosas evaluadas en este estudio fueron extractables, mientras que el 14% estuvieron ligados con proteína y el 7% lo estuvieron con fibra. Estos resultados difieren de los obtenidos con algunas leguminosas de climas templados; por ejemplo, en 11 especies evaluadas se encontró que, en promedio, la fracción de taninos extractables constituyó 65% de los taninos condensados, mientras que los taninos ligados con proteína y fibra constituyeron 32% y 3%, respectivamente (Terrill et al., 1992). En futuros trabajos con algunas leguminosas tropicales es importante medir la distribución de taninos en la planta e investigar el efecto de los taninos extractables y ligados con proteína y fibra en la nutrición de rumiantes.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo permiten concluir lo siguiente:

- (1) El nivel de taninos condensados extractables en las hojas de las leguminosas fue menor en muestras congeladas y en muestras secadas en horno, que en muestras liofilizadas.
- (2) En las muestras liofilizadas se redujo la proporción de taninos ligados a la proteína y a la fibra de la planta.
- (3) La actividad biológica de los taninos en las muestras de las leguminosas liofilizadas fue mayor que en las muestras frescas congeladas y que en las secadas en horno.
- (4) Por lo anterior, la liofilización fue el mejor método de conservación de muestras para el análisis de taninos en las leguminosas evaluadas.

En este estudio, el método de conservación de las muestras de leguminosas tuvo poco efecto en el grado de polimerización relativa de los taninos. Sin embargo, se observó que la

Cuadro 4. Efecto del método de secado en la distribución de los taninos condensados en el tejido de algunas leguminosas tropicales.

Leguminosas* (No. CIAT)	Tipo de secado	Taninos (%)*			
		Extractables	Ligados a proteína	Ligados a fibra	Total
<i>Desmodium ovalifolium</i> (350)	En horno	2.9	0.6	0.7	4.2
	Liofilización	4.5	0.4	0.5	5.4
<i>Dioclea guianensis</i> (19391)	En horno	18.6	4.4	3.2	26.2
	Liofilización	20.3	3.2	1.6	25.0
<i>Flemingia macrophylla</i> (17403)	En horno	22.5	11.5	3.2	37.3
	Liofilización	27.6	7.8	3.1	38.8
<i>Phyllodium</i> spp. (23958)	En horno	13.3	3.9	1.5	18.7
	Liofilización	14.5	3.6	1.7	19.8
<i>Tadehagi</i> spp. (13269-274)	En horno	13.8	1.0	0.8	15.6
	Liofilización	16.0	0.3	0.2	16.4
Promedio	En horno	14.2 b	4.3 a	1.9 a	20.4
	Liofilización	16.7 a	3.0 b	1.4 b	21.1
E.S.M.		0.20	0.06	0.01	0.19

La interacción leguminosa x método de secado no fue significativa en la distribución de taninos ($P > 0.05$).

* Determinados por el método de Terrill et al. (1992), modificado.

** Promedios en una misma fila seguidos por letras iguales no difieren entre sí ($P < 0.05$), según la prueba de Duncan.

actividad biológica de los taninos fue mayor en leguminosas con taninos de menor grado de polimerización relativa. Esto sugiere que en la evaluación de leguminosas tropicales con taninos, es necesario medir no sólo el nivel de éstos, sino también el tipo de taninos presentes en el tejido vegetal.

Summary

A study with tropical legumes (*Calliandra* spp., *Dioclea guianensis*, *Flemingia macrophylla*, *Phyllodium* spp., *Tadehagi* spp., and *Desmodium ovalifolium*) was conducted to determine the effect of forage preservation method on tannin level and biological activity. Fresh-frozen, freeze-dried or oven-dried leaf samples of the legumes were analyzed for extractable condensed tannins (Butanol-HCl) and for tannins bound to protein and fiber. Relative degree of polymerization of tannins and their capacity to precipitate protein (BSA) were also measured.

Level of extractable condensed tannins was higher in freeze-dried legume samples than in fresh-frozen and oven-dried samples. Freeze-drying also resulted in higher precipitation of protein by tannins, and in less tannins bound to plant protein and fiber. Thus, freeze-drying was the best preservation method for tannin analysis in the tropical legumes evaluated.

Method of forage preservation had a negligible effect on relative polymerization of tannins. However, legumes with what appeared to be less polymerized tannins precipitated more protein (BSA) than legumes with more polymerized tannins. These suggest that in the evaluation of tropical legumes it is necessary to measure not only the level of condensed tannin but also the type of condensed tannin present in the plant.

Referencias

- Ahn, J. H.; Robahn, J. H.; Robertson, B. M.; Elliot, R., Guttridge, R. C.; and Ford, C. W. 1989. Quality assessment of tropical browse legumes: Tannin content and protein degradation. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 27:147-156.
- Asquith, T. N. and Buttler, L. G. 1985. Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannins. *J. Chem. Ecol.* 11:1535-1544.
- Cano, R. 1993. Evaluación de métodos para determinar taninos condensados en algunas leguminosas tropicales. Trabajo dirigido de grado de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia. 99 p.
- Goldstein, J. L. and Swain, T. 1963. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry* 2:371-383.
- Hagerman, A. E. 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ecol.* 13:437-439.
- Lareo, L. R.; Barona, E.; and Sarria, L. 1990. Radial diffusion as a screening method for tannin-protein binding capacity in foods and feeds. En: *Proceedings of the International Conference of Group Polyphenols*, 15th. University of Louis Pasteur, Strasbourg, Francia. p. 248-252.
- Oh, H. and Hoff, J. E. 1979. Fractionation of grape tannins by affinity chromatography and partial characterization of the fractions. *J. Food Sci.* 44:87-99.
- Perdomo, P. 1991. Adaptación edáfica y valor nutritivo de 25 especies y accesiones de leguminosas arbóreas y arbustivas en dos suelos contrastantes. Trabajo dirigido de grado de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia. 127 p.
- Porter, L. H.; Hrstich, L. N.; and Chan, B. C. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25:223-230.
- Terrill, T. H.; Windham, W. R.; Evans, J. J.; and Hoveland, C. S. 1990. Condensed tannin concentration in *Sericea lespedeza* as influenced by preservation method. *Crop Sci.* 30:219-224.
- _____; Rowan, A. M.; Douglas, G. B.; and Barry, T. N. 1992. The determination of extractable, protein-bound and fibre-bound condensed tannins in forage plants, protein concentrate meals and cereal gains. *J. Sci. Food Agric.* 58:321-329.