

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**“EVALUACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS EN GRANOS DE SORGO  
ALMACENADOS EN SILOS EXPERIMENTALES CON DISTINTAS HUMEDADES  
Y AGREGADO DE INOCULANTE”**

**por**

**BESOZZI SILVEIRA, Pierina  
LAGOS MOREIRA, Ramiro Martín\*  
OLASO BOZZO, Sebastián**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal,  
Tecnología de los Alimentos\***

**MODALIDAD: Ensayo experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2015**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

**Presidente de Mesa:**

.....  
**Dr. Álvaro Santana**

**Segundo Miembro (Tutor):**

.....  
**Dra. Carmen García y Santos**

**Tercer Miembro:**

.....  
**Dra. Virginia Mosca**

**Cotutor:**

.....

**Fecha: 23/10/2015**

**Autores:**

.....  
**Pierina Besozzi Silveira**

.....  
**Ramiro Martín Lagos Moreira\***

.....  
**Sebastián Olaso Bozzo**

## **AGRADECIMIENTOS**

- ✓ A nuestra tutora la Dra. Carmen García y Santos por su apoyo, orientación y disposición. Como también al personal de la cátedra de Toxicología de la Facultad de Veterinaria.
  
- ✓ Al Departamento de Nutrición, por el préstamo de materiales y consultas en este trabajo.
  
- ✓ A la Dra. Deborah Basilio por su dedicación y tiempo en la orientación de nuestro trabajo.
  
- ✓ Al Dr. Fernando Vila, Dr. José Piaggio y Dr. Gonzalo Suárez por contribuir a los análisis estadísticos.
  
- ✓ A la Dra. Alejandra Capelli, por su contribución y aportes.
  
- ✓ A nuestras familias, amigos y compañeros por su apoyo incondicional y ayuda en todo momento.
  
- ✓ A la Facultad de Veterinaria por la posibilidad de formarnos en esta linda y grata profesión.

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadros</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro I.</b> Genotipos de los granos y características de los cultivos de sorgo de cinco establecimientos lecheros comerciales.	19
<b>Cuadro II.</b> Composición química de los granos de sorgo del experimento 1.	19
<b>Cuadro III.</b> Composición química de los granos de sorgo del experimento 2.	20
<b>Figuras</b>	
<b>Figura 1.</b> Estructura del grano de sorgo. Corte transversal del grano de sorgo.	10
<b>Figura 2.</b> Cultivo de Sorgo Granífero.	11
<b>Figura 3.</b> Almacenamiento de grano de sorgo en silo-bolsas.	11
<b>Figura 4.</b> Esquema explicativo de la obtención de las muestras y elaboración de los microsilos.	18
<b>Figura 5.</b> Esquema explicativo de la obtención de las muestras del segundo experimento y elaboración de los microsilos.	20
<b>Figura 6.</b> Molienda de muestras.	21
<b>Figura 7.</b> Secado de muestras.	21
<b>Figura 8.</b> Muestras en baño María.	22
<b>Figura 9.</b> Balones con extracción de taninos condensados.	22
<b>Figura 10.</b> Efecto de los tratamientos de humedad baja, media y alta.	25
<b>Figura 11.</b> Efecto del agregado de inoculantes sobre la concentración de taninos condensados.	26

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
SORGO .....	9
Característica y estructuras del sorgo .....	9
Clasificación de sorgos .....	10
ENSILAJE.....	11
Ensilaje de grano húmedo de sorgo .....	12
Aditivos presentes en el ensilaje .....	13
Inoculantes, sustancias que inhiben la fermentación.....	13
TANINOS.....	13
Complejo tanino-proteína.....	15
Cuantificación de taninos.....	15
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
DISEÑO EXPERIMENTAL .....	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>30</b>

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la humedad y del agregado de un inoculante comercial sobre la concentración de taninos condensados (TC) en granos de sorgo de genotipos altos (AT) y bajos (BT) en taninos, ensilados durante 180 días en microsilos experimentales. Para evaluar el efecto de la humedad se obtuvieron muestras de granos de sorgo de 5 establecimientos lecheros comerciales diferentes, al momento de la cosecha. Cada una de las muestras fue dividida para recibir 3 tratamientos de humedad: baja ( $H_1$ : 15-22%, secado a temperatura ambiente), media ( $H_2$ : 23-32%, humedad de cosecha) y alta ( $H_3$ : 33-42%, agregando agua destilada). Se realizaron un total de 45 microsilos (5 establecimientos  $\times$  3 tratamientos de humedad  $\times$  3 réplicas). Para evaluar el efecto del inoculante comercial, se obtuvieron granos de sorgo de otro establecimiento y se ensilaron en 20 microsilos experimentales. La mitad de las muestras fueron tratadas con un inoculante comercial homofermentativo y la otra mitad fueron controles. La concentración de TC en % de materia seca (MS), se determinó por despolimerización oxidativa en butanol-HCl y lectura por espectrofotometría (550 nm). Los datos obtenidos en el primer experimento fueron analizados estadísticamente mediante un diseño ANOVA a dos vías, siendo factores fijos los genotipos de sorgos (AT y BT) y los tratamientos de humedad (baja, media y alta). Se consideraron diferencias significativas valores ( $P < 0.05$ ). En el segundo experimento, se aplicó Test de Student y se consideraron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ). Los resultados del primer experimento no mostraron interacción entre genotipos de taninos y tratamientos de humedad. Si existió diferencia significativa en la concentración de TC entre genotipos AT, al ser comparados con los BT. Las concentraciones de taninos de los sorgos AT promediaron  $0,25 \pm 0,17\%$ , mientras que el promedio de los sorgos BT fue de  $0,12 \pm 0,07\%$ . Los resultados del segundo experimento mostraron una reducción de la concentración de TC en los microsilos tratados con inoculante que presentaron concentraciones promedio de TC de  $0,16 \pm 0,09\%$ MS, respecto a los microsilos controles  $0,48 \pm 0,12\%$ MS. Los diferentes tratamientos de humedades no afectaron las concentraciones de TC en los microsilos experimentales. El agregado de inoculante comercial podría contribuir a la disminución significativa de la concentración de TC en los microsilos experimentales.

## SUMMARY

The aim of this work was to evaluate different moisture levels and the addition of commercial inoculants on sorghum grains with high (HT) and low (LT) tannin content ensiled for 180 days in experimental microsilos. In the first experiment, the grains obtained at harvesting were ensiled in microsilos with three moisture treatments: low (15-22%, dried at room temperature), medium (23-32%, same as at harvest) and high (33-42%, moisten with distilled water). A total of 45 microsilos were made (5 farms × 3 moisture treatments × 3 replicas). In the second experiment, sorghum grains samples were obtained from a different dairy farm and ensiled in 20 experimental microsilos. Half of the microsilos were treated with a homofermentative commercial inoculant, and the others were controls. The concentration of condensed tannins (CT) in dry matter percentage (% DM) was determined by oxidative depolymerization in butanol-HCl and measured spectrophotometrically (550 nm). Experiment 1 results were analysed statistically by two-way ANOVA, considering as fixed effects the genotype of sorghum grains (HT and LT) and moisture content (low, medium, high) and interactions among genotype and moisture content, significant difference was considered ( $P < 0.05$ ). Results from experiment 2 were analysed by Student's Test and significant difference was considered ( $P < 0,001$ ). Experiment 1 did not present interaction among tannins and moisture. No significant difference was observed among moisture levels. The tannin concentration of the HT microsilos had an average of  $0,25 \pm 0,17\%$  and LT average was  $0,12 \pm 0,07$ . In experiment 2, the results did show significant difference among the microsilos with inoculant and the control group. The microsilos that were treated with inoculant showed an average concentration value of  $0,16 \pm 0,09$  %MS, while the average in the microsilos controls was  $0,48 \pm 0,12$  %MS. The different moisture treatments did not affect the CT in the experimental microsilos. The addition of the commercial inoculant must contribute to a significant decrease on the concentration of tannins in the experimental microsilos.

## INTRODUCCIÓN

El sostenido crecimiento de la economía mundial y la modificación del consumo alimentario de la población, impulsan una expansión en el mercado agroalimentario. En la búsqueda de sistemas alimentarios más eficientes, se han difundido estrategias como la producción de granos y/o ensilajes. Es así, que el uso de ensilaje de grano húmedo se ha visto incrementado en las últimas décadas (Chalkling y Bradesco, 1997). Esta técnica, mejora el aprovechamiento digestivo de los cereales, particularmente de sorgo (Curbelo, 2010).

El grano de sorgo presenta taninos condensados (TC) en su estructura, estos compuestos infieren un sabor astringente, lo que brinda ventajas agronómicas. Entre estas ventajas está una mayor resistencia al ataque de pájaros, insectos y condiciones climáticas adversas (Ramírez y Araque, 1998). Pero los taninos, presentan un efecto antinutricional, disminuyendo el valor nutritivo de los alimentos. Existen genotipos de sorgo altos (AT) y bajos (BT) en concentraciones de taninos (Barrera y col., 1998). Los genotipos con mayor contenido en TC, se asocian a una menor calidad nutricional (Doudu y col., 2003).

El efecto negativo de los TC en el sorgo, puede minimizarse por diferentes técnicas, como el quebrado de los granos (Chibber y col., 1978). La fermentación anaeróbica que ocurre en el proceso de ensilaje, también disminuiría las concentraciones de TC (Myachoti y col., 1995), aumentando la disponibilidad de nutrientes en granos de sorgo (Mitaru y col., 1984). La humedad, mejoraría las características fermentativas y el aprovechamiento digestivo de los granos de sorgo por parte de los rumiantes (Huck y col., 1999). La adición de sustancias como álcalis o ácidos, en los ensilajes de sorgo, también desactivarían los taninos (Mitaru y col., 1984; Beta y col., 2000).

El agregado de inoculantes para mejorar la conservación de alimentos, es una práctica difundida en los ensilajes. Los inoculantes, son microorganismos que generan una acidificación del material ensilado, logrando una estabilización más rápida. Además producen una conservación más prolongada en el tiempo y un mejor aprovechamiento del alimento por los animales (Mc Donald y col., 1991). En procesos fermentativos de plantas con taninos, es común el uso de *Lactobacillus plantarum* como inoculante (Contreras-Govea y col., 2009). Algunas cepas de esta bacteria, pueden poseer actividad tanasa (Nishitani y Osawa, 2003; Nishitani y col., 2004; Vaquero y col., 2004). Estas enzimas, podrían disminuir el contenido de los taninos del sorgo (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

En el ensilaje de grano húmedo de sorgo, la calidad del producto final guarda estrecha relación con su proceso de elaboración. Por eso, factores como humedad o agregado de inoculantes, pueden alterar la composición química final del alimento. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la humedad y el agregado de un inoculante comercial sobre la concentración de TC en granos de sorgo de genotipos AT y BT ensilados durante 180 días en microsilos experimentales.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### SORGO

#### Características y estructura del Sorgo

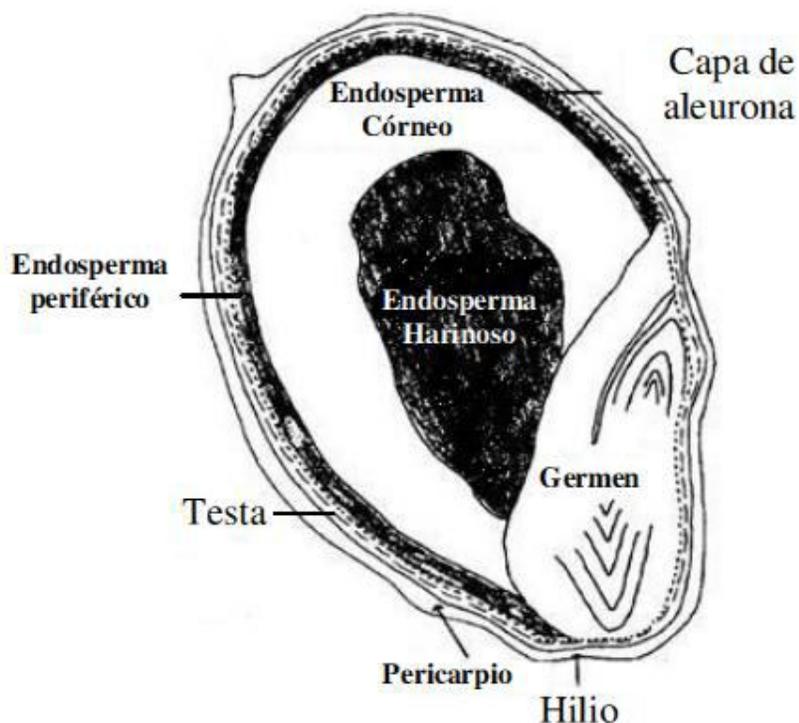
El sorgo es una gramínea de origen tropical, adaptado mediante programas de mejoramiento genético a climas templados. Debido a esta característica es una de las plantas más cultivadas a nivel mundial, constituyéndose también en uno de los granos de mayor uso en la alimentación animal y humana. En Uruguay, junto con maíz, es uno de los granos más utilizados en la alimentación de los rumiantes (DIEA, 2014). Su valor nutritivo depende del genotipo y del tipo de procesamiento utilizado (quebrado, molido, ensilado, entre otros) (Streeter y col., 1990).

El grano de sorgo posee características que lo distinguen del resto de los cereales, presenta una gran variabilidad en su composición química, tipo de endosperma y condiciones ambientales durante el crecimiento y maduración del grano (Hibberd y col., 1982). Como se puede observar en la figura 1, la estructura del grano se divide en tres componentes principales: el pericarpio, capa que lo recubre y protege (8 % del peso total), el germen del grano o embrión (7-12%) y el endosperma, tejido de almacenamiento que representa entre 80 y 85% de su totalidad (Waniska, 2000).

El pericarpio se subdivide en tres fracciones: epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El epicarpio es la capa más externa, el mesocarpio se encuentra por debajo, pudiendo variar su espesor según el contenido de almidón. La capa más interna o endocarpio es el principal punto de ruptura al moler el grano. El color del pericarpio varía de blanco, amarillo a marrón. Son los granos marrones los que poseen una testa formada por TC (Domanski y col., 1997).

El embrión o germen se conforma del eje embrionario y el escutelo. Es la fracción del grano con mayor porcentaje de proteínas, lípidos y minerales, constituyendo cerca del 10 % del peso seco del grano (Domanski y col., 1997).

El endosperma se subdivide en: la capa de aleurona, endosperma periférico, córneo y harinoso. La aleurona es la cubierta más externa, formada por un único estrato de células con alta proporción de proteínas y ausencia de almidón. El endosperma periférico, está formado por varias capas celulares que contienen gránulos de almidón pequeños, mientras que en el endosperma corneo los gránulos de almidón son de mayor tamaño y de forma poligonal. El endosperma harinoso es la estructura más interna y posee gránulos de almidón esféricos y de gran tamaño, la matriz proteica es discontinua con espacios de aire. Esta última tiene gran importancia sobre el efecto de la digestión enzimática de los gránulos de almidón (Kotarski y col., 1992).



**Figura 1:** Estructura del grano de sorgo. Corte transversal del grano (Fuente: Montiel y Elizalde, 2004)

### Clasificación de Sorgos

Los sorgos pueden clasificarse de acuerdo a distintos criterios. Desde el punto de vista productivo se clasifican en sorgos forrajeros, graníferos y sileros.

**Sorgos forrajeros:** incluyen los fotosensitivos y el conocido como Sudán grass.

Fotosensitivos: no florecen en estas latitudes, por lo cual no producen granos, limitando el contenido energético del silo. Su destino principal es el pastoreo, generando mayor volumen de forraje (Martin, 2005).

Sudan o Sudán grass: son los más adaptados a pastoreos directos, con buena producción de forraje y gran capacidad de rebrote (Carámbula, 2007).

**Sorgos Graníferos:** llegan a desarrollar una altura promedio entre 0.5 y 1.5 metros (Bennett y Tucker, 1986). Es una variedad muy buena para producir granos, pero no para ser utilizados en pastoreos directos. Se estima que el % de rendimiento del componente grano está entre un 30 y 65%MS del total del grano. (Chessa, 2007). Dentro de los sorgos graníferos podemos destacar la clasificación por el color del grano, diferenciando los tonos amarillos, rojos y marrones, asociándose esta característica con el contenido de tanino. El contenido de taninos del sorgo varía ampliamente (0,2 a 6,9%) de acuerdo a la variedad, siendo los amarillos los de menor concentración y los marrones los de mayor concentración de TC (ver figura 2) (Molinari y Antunez, 2005).

**Sorgos Sileros:** provienen de una mezcla entre sorgos graníferos y forrajeros azucarados, generando una muy buena relación hoja-tallo-panoja. Pueden llegar a desarrollar una altura de hasta 2.6 metros. Alcanzan altos rendimientos al ser ensilados y además su alto contenido en azúcares solubles favorece una rápida fermentación del material ensilado (Coria, 2011).



**Figura 2.** Cultivo de sorgo granífero.

## ENSILAJE

Es un proceso de conservación de alimentos en fresco. Es una tecnología que permite transferir y utilizar alimentos de épocas de mayor potencial de producción a otras de menor potencial. El ensilaje conserva el grano en un medio anaerobio (sin aire), evitando pérdidas del valor nutritivo. Existen diferentes tipos de ensilajes, de planta entera, de grano seco y de grano húmedo (Scarpitta, 2008). El silo es el lugar o construcción donde se produce dicho fenómeno y permite conservar el forraje y/o grano (Contreras-Govea y col., 2009).

Los silos pueden ser tipo torta, trinchera o silo-bolsa (Figura 3), siendo estos últimos los más utilizados (Chalkling y Bradesco, 1997).



**Figura 3:** Almacenamiento de grano de sorgo en silo-bolsas.

## Ensilaje de grano húmedo de sorgo

La técnica de ensilaje de grano húmedo, surge en Estados Unidos a comienzos de la década de los ochenta. Dicha forma de almacenamiento permite preservar el valor nutritivo del grano, conservando el grano cosechado sin secar, en ausencia de aire y con una humedad promedio entre 23 a 40% (Scarpitta, 2008).

La demanda mundial del cultivo de sorgo ha aumentado, pasando a ser el quinto cereal en importancia a nivel mundial (Colazo y col., 2012). Parte del auge que ha tenido el sorgo, se debe a la difusión de la técnica de “ensilaje de grano húmedo” surgida como una alternativa a la tradicional cosecha de grano seco (Chalking y Bradesco, 1997). En este proceso, independientemente del ensilaje, la humedad mejora la digestibilidad de los granos de sorgo. El agregado de agua (reconstituido), mejora la digestibilidad de los granos secos de sorgo. Cuando los porcentajes de humedad están entre 25 y 35%, mayor es la productividad, mejores son las características fermentativas y el aprovechamiento digestivo por parte de los rumiantes (Huck y col., 1999).

Russell y Lolley (1989) observaron una inactivación del 86% de los taninos de granos de sorgo reconstituidos (rehidratados a 34% de humedad) y tratados con 2% de urea. Estos autores también reportan una desactivación casi total de los taninos en el grano reconstituido, sin agregado de urea, sugiriendo que la desactivación de los taninos se debería al reconstituido con agua. La humedad, incrementa la degradabilidad de los granos ensilados, volviendo el almidón más amorfo y susceptible a la degradación enzimática. Varios trabajos indican que a mayor porcentaje de humedad del grano al momento del ensilaje, mayor es el valor nutritivo (Stock y Mader 1987; Curbelo, 2010). Montiel y Elizalde (2004), obtuvieron una mayor degradabilidad efectiva de la materia seca (MS) en sorgos AT, cosechados con 35% en relación a sorgos cosechados con 25% de humedad.

En investigaciones previas se estudió la dinámica de los taninos condensados de granos húmedos de sorgo almacenados en silo-bolsas, en donde se constató un descenso significativo de las concentraciones de los TC, principalmente de los genotipos AT. Este descenso de TC, fue considerado por los autores como propio del proceso de ensilaje (Basilio y Orihuela 2012).

Se sabe que el contenido de humedad así como un suficiente tiempo de fermentación, son factores fundamentales para una mejor digestibilidad de los alimentos almacenados. El tipo y actividad de bacterias presentes en el ensilaje es clave para una correcta fermentación (Curbelo, 2010). Las bacterias productoras de ácido láctico (BAL) son microorganismos benéficos, fundamentales en el proceso de conservación de forrajes y granos. En cambio, existen otros microorganismos indeseables, como clostridios, enterobacterias, mohos y levaduras que llevan al deterioro del material conservado, reduciendo el valor nutritivo de los alimentos (FAO-IAEA, 2001). Estos últimos combinados con una excesiva exposición al aire, humedad y altas temperaturas, provocan problemas nutricionales y sanitarios en los animales que lo consumen (Andrade y Mohamad, 2010).

## **Aditivos para ensilaje**

Son sustancias que se utilizan con el fin de mantener el alimento estable por un tiempo determinado, evitando la producción de hongos y bacterias. Los aditivos se clasifican en nutrientes, adsorbentes y sustancias que inducen o inhiben la fermentación (Gil y Eusse, 2000).

Los nutrientes pueden formar otros elementos que contribuyen al enriquecimiento del ensilado, como urea que aumenta la formación de nitrógeno (Gil y Eusse, 2000). Los adsorbentes se utilizan para prevenir cambios de conformación físicos y químicos y evitan la pérdida masiva de agua del material ensilado (Mc Donald y col., 1991). Las sustancias que inducen la fermentación son inoculantes. Por último, los inhibidores se utilizan para reducir las pérdidas por fermentaciones secundarias al momento de apertura de los silos, así como para aumentar la vida útil de los mismos (Chalkling y Bradesco, 1997).

### **Inoculantes, sustancias que inducen a la fermentación**

Los inoculantes son sustancias inocuas que contribuyen a una mayor conservación del alimento en el tiempo y a un mayor aprovechamiento por parte del animal. Su utilización, es una práctica agropecuaria difundida desde la década de los noventa (Mc Donald y col., 1991).

Se clasifican en dos grupos, los homofermentadores y los heterofermentadores. Los primeros producen ácido láctico, mientras los últimos producen ácido láctico, ácido acético y dióxido de carbono. Entre los primeros se encuentra el *Lactobacillus plantarum*. Esta es una bacteria ácido láctica (BAL), utilizada como inoculante fundamentalmente en procesos fermentativos de plantas y derivados en donde los taninos son abundantes. Entre los heterofermentadores está el *Lactobacillus buchneri*, cuyo uso también es difundido como los primeros (Contreras-Govea y col., 2009).

## **TANINOS**

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas. Químicamente están formados por polímeros de compuestos fenólicos, que tienen la habilidad de establecer complejos con varios tipos de moléculas, principalmente proteínas y carbohidratos (Reed, 1995; Ramírez y Araque, 1998). Entre los cereales, son los sorgos los únicos capaces de producir importantes cantidades de taninos. Su contenido oscila entre 0,2 y 6,9 % de la MS de los sorgos (Evers y col., 1999).

Existen dos grandes grupos de taninos, los hidrolizables y los condensados o proantocianidinas. Los hidrolizables son poliésteres de ácido gálico y diversos azúcares individuales, son más susceptibles a la hidrólisis y más solubles en agua que los condensados (Mc Sweeney y col., 2001).

Los TC, son compuestos más simples, formados por uniones de polímeros de elevado peso molecular (Doudu y col., 2003). Estas uniones ligadas por enlaces de carbono le confieren mayor resistencia a la hidrólisis. Esta característica y la capacidad de formar fuertes enlaces con proteínas, son factores fundamentales en sus efectos nutricional y toxicológico (Reed, 1995).

Las principales diferencias entre genotipos de sorgos están dadas, por las características del endosperma y por la presencia de TC (Maxon y col., 1973; Reed, 1995). Los sorgos con mayor contenido en taninos, se asocian a una menor calidad nutricional (Doudu y col., 2003). Por esta misma razón, presentan menor degradación y putrefacción de los granos (Reed, 1995). Además presentan menor germinación previa a la cosecha y resisten el ataque de hongos. Algunos productores prefieren sembrar estas variedades de sorgos, debido a la astringencia de estos compuestos al ser masticados por aves y/o insectos (Chessa, 2007).

En rumiantes, los taninos precipitan las proteínas que se ingieren en la dieta, aumentando su pasaje hacia el intestino delgado en donde son absorbidos (Otero e Hidalgo, 2004). Por otro lado, ensayos de alimentación con sorgos en no rumiantes, han demostrado que los TC tienen un impacto negativo en la ganancia de peso de los animales (Russell y col., 1988; Russell y Lolley, 1989; Russell y Schmidt, 1993).

Este efecto negativo de los taninos en los granos de sorgo, puede minimizarse por diferentes técnicas como el quebrado (Chibber y col., 1978), la fermentación anaeróbica (ensilado) o la adición de sustancias como álcalis o ácidos (Mitaru y col., 1984; Beta y col., 2000). El tratamiento con urea, 3 a 4 kg por cada 100 kg de MS de sorgo, asegura una buena conservación del grano. Además, desactiva los taninos 10 días posterior a su aplicación, altera la cubierta del grano, incrementa la digestión del almidón y aumenta la ganancia de peso en los animales (Russell y col., 1988; Russell y Lolley, 1989; Russell y Schmidt, 1993).

Según Cummins (1971), la digestibilidad del grano aumenta con el ensilaje debido a la reducción de taninos, 50 a 60% en sorgos AT y de 65 a 75% en sorgos BT. Estos tratamientos además de reducir los TC, alteran el endosperma, aumentando la digestibilidad del almidón (Hill y col., 1991). Myachoti y col. (1995), atribuyen la reducción de concentraciones de taninos en granos de sorgo, a la elevada humedad en el ensilaje. Sin embargo, Borges (1995), sostiene que la reducción de taninos en ensilajes de grano húmedo de sorgo, se debería al propio proceso de fermentación.

En ensilajes de plantas y granos, donde los taninos son abundantes, se utiliza inoculante comercial con cepas de *L. plantarum* que poseen actividad tanasa (Nishitani y Osawa, 2003; Nishitani y col., 2004; Vaquero y col., 2004). Las tanasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster en los taninos hidrolizables (Rodríguez y col., 2009). La presencia de estos microorganismos, también podría disminuir el contenido de los taninos del sorgo (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001). Algunos hongos, también producirían tanasas que degradan los TC de ciertas plantas (Akroum y col., 2009).

## **Complejo tanino- proteína**

Los taninos tienen importancia en la nutrición animal por formar complejos con proteínas, carbohidratos, paredes celulares bacterianas y enzimas digestivas. La unión del complejo tanino-proteína depende de ambas estructuras, del tanino y de la proteína (Neucere y col., 1978; Barry y col., 1986; D' Mello, 1992). Las interacciones entre proteínas y taninos están basadas en enlaces de hidrógeno, hidrofóbicos, iónicos y covalentes, aunque estos últimos son menos frecuentes. Estas interacciones se intensifican con la movilidad conformacional y el peso molecular de los taninos. Cuanto más largas las proteínas, más fuerte es la unión (Muller-Harvey y McAllan, 1992). El grupo fenólico del tanino dona los hidrógenos para formar fuertes enlaces con el grupo carboxilo de la proteína. Es por esta razón que los taninos tienen excelente afinidad con las proteínas y no con el almidón (Romero Lara y col., 2000).

A valores de pH cerca del punto isoeléctrico de las proteínas, la precipitación de estas por parte de los taninos es máxima. En solución con pH alto, los hidroxilos fenólicos son ionizados y las proteínas tienen una carga negativa neta. Bajo estas condiciones, la precipitación no ocurre por las fuerzas repulsivas que ejercen las proteínas (Muller-Harvey y McAllan, 1992). El complejo tanino-proteína es insoluble a pH ruminal (4-7). Sin embargo es soluble tanto a pH ácido de abomaso (menor a 4) como a pH alcalino de intestino delgado (mayor a 8). De esta forma la proteína de la dieta escaparía a la degradación ruminal llegando tal cual a los sitios de digestión (Fernández Mayer, 2006).

Cuando los taninos interactúan con las proteínas, se forman complejos solubles e insolubles. Estos complejos dependen de la concentración y tamaño de ambas moléculas. La formación de complejos insolubles es favorecida cuando los taninos están presentes en exceso. Cuando la proteína está en exceso, los complejos permanecen solubles debido a que cada molécula de proteína está unida solamente por pocos enlaces fenólicos (Hagerman, 1992).

## **Cuantificación de taninos**

Los taninos tienen una estructura heterogénea que dificulta su cuantificación (Martin y Martin, 1982). Por su composición química pueden ser degradados a flavonoides, permitiendo de esta manera un mayor monitoreo de los mismos al presentarse en diferentes alimentos. Existen varias técnicas para cuantificar TC, siendo de preferencia las de tipo colorimétrico (Terrill y col., 1992). Según Reed (1995), equiparar fenoles con taninos no es del todo sencillo, ya que muchos fenoles reaccionan con reactivos analíticos que no son estrictamente taninos; igualmente pueden convertirse en taninos por polimerización oxidativa. Por lo tanto, es necesario estimar el total de los fenoles y taninos además de sus efectos biológicos.

Según FAO-IAEA (2000), los métodos de cuantificación de taninos pueden basarse en sus propiedades químicas o en su capacidad para unirse a sustratos, especialmente proteínas. Estos métodos pueden ser clasificados en métodos químicos y aglutinantes. Dentro de los métodos químicos se encuentra el utilizado en este estudio, conocido como *Determinación de los taninos condensados*. Está basada en la despolimerización oxidativa que sufren los TC en reactivo butanol-HCl. La presencia de un agente férrico es utilizada para aumentar la reproductibilidad y sensibilidad del ensayo.

## **HIPÓTESIS**

El aumento de la humedad en los diferentes tratamientos disminuye la concentración de TC en granos húmedos de sorgo ensilados.

La aplicación de inoculantes en el ensilaje disminuye la concentración de TC en granos húmedos de sorgo.

## **OBJETIVOS**

### **➤ Objetivo general**

Evaluar el efecto de la humedad sobre la concentración de taninos condensados de granos de sorgo de genotipos altos y bajos en taninos, y el agregado de inoculante comercial almacenados durante 180 días en microsilos experimentales.

### **➤ Objetivos específicos**

Determinar y comparar la concentración de TC de granos de sorgo tratados con humedades altas (33-42%), medias (23-32%) y bajas (15-22%), almacenados durante 180 días en microsilos experimentales.

Determinar y comparar la concentración de TC de granos de sorgo con y sin agregado de un inoculante comercial almacenados durante 180 días en microsilos experimentales.

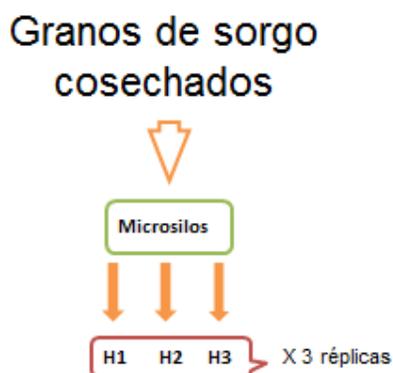
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Para llevar a cabo este trabajo se realizaron dos experimentos. El primero, para evaluar la concentración de TC en granos de sorgo almacenados en microsilos experimentales con distintas humedades. El segundo experimento, para evaluar la concentración de TC en granos de sorgo almacenados en microsilos experimentales, con y sin agregado de un inoculante comercial. Las muestras de ambos experimentos, fueron obtenidas previamente, para realizar el trabajo de Doctorado sobre el estudio de la evolución de hongos toxicogénicos, micotoxinas y valores nutritivos de silos de grano húmedo de sorgo, de la Dra. María del Carmen García y Santos.

### Experimento 1

Las muestras utilizadas para la determinación de los TC fueron extraídas de silo-bolsas de grano húmedo de sorgo de 5 establecimientos lecheros remitentes a CONAPROLE de los departamentos de San José, Flores y Canelones. Tres de ellas correspondieron a muestras de genotipos AT y las otras dos a genotipos BT.



**Figura 4:** Esquema de la obtención de las muestras y elaboración de los microsilos.  $H_1$ : (15-22%),  $H_2$ : (23-32%) y  $H_3$ : (33-42%).

En el cuadro 1, se puede apreciar los genotipos de sorgos y las características de los cultivos y cosechas de los sorgos estudiados en este experimento.

**Cuadro 1:** Genotipos de los granos y características de los cultivos de sorgo de cinco establecimientos lecheros comerciales.

Muestra	Genotipo Sorgo	Fecha siembra	Fecha cosecha	Humedad cosecha %	Tenor de Taninos
1	Aca 558	11/12/09	01/05/10	29,8	AT
2	Morgan 108	27/11/09	12/05/10	30,4	AT
3	Aca 558	15/12/09	03/05/10	27	AT*
4	Flash 10	02/01/10	10/05/10	32	BT
5	Aca 546	28/12/09	08/06/10	27	BT*

AT: altos taninos; BT: bajos taninos; \*muestras con inoculante Biomax®

Las variedades AT y BT, fueron consideradas de acuerdo a la evaluación realizada mediante la técnica de Vainillina-HCl en el Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Semillas (INASE) y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). En el cuadro 2 se puede ver la composición química de los granos utilizados en este experimento.

**Cuadro 2:** Composición química de los granos de sorgo del experimento 1 evaluados previamente al ensilaje.

Muestra	MS	CEN	PB	FND	FAD	pH	TC
1	65,15	2,26	6,79	18,04	11,23	5,94	0,78
2	63,79	2,58	8,15	16,37	9,22	4,89	1,23
3	77,65	2,23	6,43	15,89	11,52	5,95	0,32
4	61,3	2,03	7,30	14,94	5,95	4,51	0,09
5	79,59	1,98	9,09	13,27	5,98	6,53	0,07

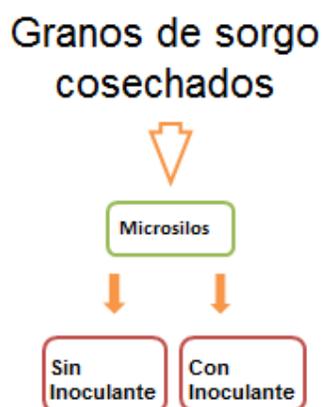
MS: % de materia seca de las muestras frescas; Cen: cenizas; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente, expresadas como porcentaje de la MS; TC: taninos condensados, expresados como porcentaje de la MS.

En cada establecimiento, se colectaron muestras de 30 kg de granos de sorgo al momento de la cosecha. Cada una de las muestras fue dividida para recibir 3 tratamientos distintos de humedad: baja (15-22%, secado a temperatura ambiente), media (23-32%, humedad que traían del campo) y alta (33-42%, con agregado de agua destilada).

Los granos tratados con las distintas humedades, fueron ensilados manualmente en microsilos experimentales, en envases herméticos de plástico de 3 kg de capacidad. Se realizaron un total de 45 microsilos. Fueron abiertos para efectuar las mediciones a los 180 días de almacenamiento.

## Experimento 2

Para el segundo experimento, se colectaron 60 kg de granos de sorgo variedad summer T70 de un único establecimiento. Los granos fueron clasificados con tenores intermedios de TC, según INASE-INIA. Fueron sembrados entre el 14 y 15 de noviembre del 2011 y cosechados el 12 de abril de 2012. La humedad al momento de la cosecha fue de 26-32%.



**Figura 5:** Esquema de la obtención de las muestras del segundo experimento y elaboración de los microsilos.

La muestra de granos se obtuvo de una única chacra del departamento de Canelones al momento de la cosecha. Los granos se ensilaron manualmente en microsilos experimentales, en envases herméticos de plástico de 3 kg de capacidad, para ser abiertos a los 180 días del almacenamiento. Se realizaron 20 microsilos, 10 con el agregado de un inoculante comercial Biomax® 5 (*Lactobacillus plantarum*) y 10 microsilos como controles. Para agregar el inoculante se siguieron las instrucciones recomendadas en el envase del producto y la cantidad inoculada (1gr./ton) se realizó en escala de acuerdo al tamaño de los envases utilizados como microsilos. La composición química de los granos utilizados en este experimento se puede ver en el Cuadro 3.

**Cuadro 3:** Composición química de los granos de sorgo del experimento II evaluados previamente al ensilaje.

MS	CEN	PB	FND	FAD	pH	TC
72,74	2,28	7,20	14,94	9,39	6,26	0,53

MS: % de materia seca de las muestras frescas; Cen: cenizas; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; TC: taninos condensados, expresados como porcentaje de la MS.

## **Procedimientos y determinaciones**

A los 180 días de almacenamiento, fueron abiertos todos los microsilos y el material se conservó en bolsas plásticas identificadas, en freezer a -20°C. Las determinaciones de MS se realizaron en el Laboratorio de Análisis Químicos del Departamento de Nutrición Animal y los niveles de TC se determinaron en el Laboratorio de Toxicología, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

### ***Procesamiento de muestras***

Las muestras de sorgos se secaron a 60°C en estufa de aire forzado durante 48 h para determinar MS y posteriormente fueron molidas en un molino de rotor con criba de 1 mm (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein).



**Figura 6:** Molienda de muestras.



**Figura 7:** Secado de muestras.

### ***Extracción de los Taninos Condensados***

Para la extracción de los TC las muestras fueron molidas a 0,5 mm y se pesaron 0,2 g con una balanza de precisión (Scientech SA 210). Se colocaron en tubos, con 5 mL de éter etílico acidificado para ser centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm. De esta manera se eliminaron restos de pigmentos y grasa de las muestras secas, de modo que el sobrenadante se descartó.

Luego se adicionaron 10 mL de solución de acetona al 70 % en los tubos agitando con vórtex (Scientific Industries Genie 2), se transfirió a un vaso de Bohemia y se sometió a un tratamiento con ultrasonido durante 20 minutos en un baño ultrasónico (Cole-Parmer 8891). Nuevamente se transfirió el contenido a los tubos y se centrifugó 10 minutos más. Los sobrenadantes fueron filtrados y colectados en balones de 25 mL mantenidos en heladera a 4 °C.



**Figura 8:** Proceso de extracción de los TC. **Figura 9:** Muestras en baño María.

El sedimento sobrante fue tratado un vez más con acetona al 70 % y se repitieron los pasos de ultrasonido y centrifugado de modo de asegurar una buena extracción de los taninos. Los sobrenadantes fueron colectados en los balones refrigerados y se aforó con acetona 70 %, manteniéndolos nuevamente en heladera. El proceso de extracción realizado para cada microsilo fue hecho por duplicado para reducir el margen de error del estudio.

### ***Medición de los Taninos Condensados***

La determinación de TC se realizó por la técnica de Porter y col., (1985) adaptada por Makkar. La misma se basa en la despolarización oxidativa de los taninos en butanol-HCl (FAO – IAEA, 2000). En esta determinación, las subunidades del tanino condensado son oxidativamente fragmentadas para revelar las antocianidinas, mostrándose de color rojo en un medio ácido. El desarrollo del color depende del solvente, siendo reducido por la presencia de agua. Como el ácido tánico y la catequina comercial no muestran respuesta positiva a esta reacción, el tanino condensado necesita ser purificado en laboratorios para ser utilizado como estándar (Da Silveira Agostini-Costa y col., 2003).

Para la medición de los TC se tomó una alícuota de 500 uL de la extracción refrigerada, las cuales fueron colocadas en tubos de ensayo con rosca, adicionando 3 mL de solución de Butanol-HCl (950 mL de butanol más 50 mL de HCl) y agitando en vórtex. Luego se agregaron 250 uL de reactivo Férrico (1g de sulfato de amonio férrico en 50 mL de HCl 0,2 N) y se agitó nuevamente.

A continuación se preparó un blanco con 500 uL de acetona 70 %, 3 mL de Butanol-HCl y 250 uL de reactivo férrico. Posteriormente tanto el blanco como las muestras fueron sometidos a un baño María a una temperatura de 90 – 95 °C durante 40 minutos como se observa en la figura 9. Se midió la absorbencia a 550 nm de longitud de onda utilizando un espectrofotómetro (Spectronic 15 – Thermo Scientific.).

Los TC (% en la MS) como equivalentes de leucocianidina fueron calculados utilizando la siguiente fórmula (FAO-IAEA, 2000):

$$\text{TC (\% en MS)} = (\text{absorbancia} \times 78.26 \times 2.5) / \% \text{ MS de la muestra}$$

Nota: Este proceso también fue realizado por duplicado para cada muestra así como su medición en espectrofotómetro.

## **Análisis Estadístico**

Los datos de este experimento se analizaron por el Programa estadístico GraphPad Prism 6<sup>®</sup>, se realizó un diseño ANOVA a dos vías de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + (T*H)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y es la variable en estudio,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tenor de taninos de los sorgos  $i$  ( $i$  = alto o bajo taninos),  $H_j$  es el efecto fijo de las distintas humedades de los microsilos ( $j$  = alta, media, baja),  $(T*H)_{ij}$  es la interacción entre el tenor de taninos  $i$  y la humedad  $j$  y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error residual. La unidad experimental fue cada microsilo proveniente de establecimientos diferentes (5) por cada tratamiento de humedad (3). Se hicieron 3 réplicas. Se consideraron diferencias significativas valores ( $P < 0.05$ ). Para ver el efecto productor se realizó ANOVA de una vía, considerando como factor fijo al productor.

En el segundo experimento se utilizó el siguiente modelo

$$Y_i = \mu + I_i + \varepsilon_i$$

Donde Y es la variable en estudio,  $\mu$  es la media general,  $I_i$  es el efecto fijo del inóculo. Las medias del grupo tratado con inóculo y del control, se compararon mediante Test de Student. La unidad experimental fue cada microsilo. Se consideraron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ).

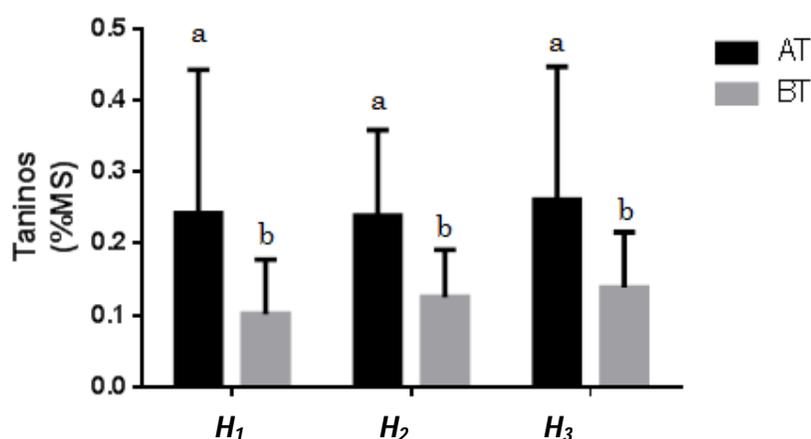
## RESULTADOS

### Experimento 1

No se detectó efecto del nivel de humedad en la concentración de TC para ninguno de los dos genotipos AT y BT, Figura 10. Si existió diferencia en la concentración de TC entre los microsilos de las muestras con AT y los microsilos con BT.

Al estudiar el comportamiento de las muestras por productor, se encontraron diferencias en la concentración de TC en los microsilos de uno de los genotipos BT. Este productor presentó concentraciones promedio más bajas que los demás. Los microsilos de este productor tenían el agregado de un inoculante comercial.

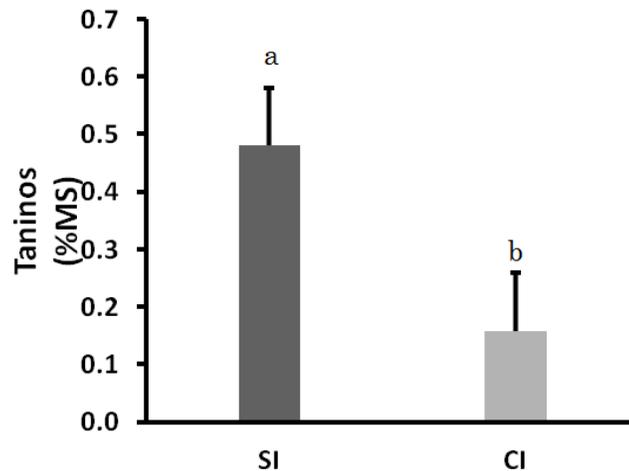
Al día 180 la concentración de taninos de las muestras AT de los microsilos tenían en promedio  $0,25 \pm 0,17\%$  de TC en % de MS. En el grupo BT la concentración fue menor ( $p = < 0,01$ ; SEM= 0,07), promediando  $0,12 \pm 0,07\%$  de TC en % de MS. Al momento del ensilaje, las muestras AT promediaban 0,78%, mientras que las BT promediaban 0,08% de TC en % MS.



**Figura 10:** Efecto de los tratamientos de humedad baja ( $H_1$ : 15-22%), media ( $H_2$ : 23-32%) y alta humedad ( $H_3$ : 33-42%) en relación a la concentración de TC (% MS) de los genotipos altos y bajos en taninos. Letras distintas indican diferencia significativa entre genotipos.

## Experimento 2

Los resultados de este experimento, mostraron que el agregado de inoculante del tipo homofermentador disminuyó las concentraciones de TC ( $p < 0,01$ ; SEM= 0,09), Figura 11. Los valores de concentración de TC de los silos tratados con inoculante fueron en promedio de  $0,16 \pm 0,09$  % de TC de % MS, mientras que en los granos sin inoculante fueron de  $0,48 \pm 0,12$  % de TC de % MS.



**Figura 11:** Efecto del agregado de inoculantes (*SI: sin inoculante; CI: con inoculante*) sobre la concentración de TC (%MS) de los granos de sorgo ensilados húmedos del experimento 2. Letras distintas indican diferencia significativa entre muestras con inoculante y controles.

Estas muestras previamente al ensilaje promediaban 0,53% de TC en % de MS.

## DISCUSIÓN

### Efecto del nivel de humedad (Experimento 1)

En las condiciones de este experimento, la humedad no afectó las concentraciones de taninos de los sorgos AT y BT almacenados en los microsilos. Estas concentraciones, tanto en los genotipos altos, como en los bajos, se mantuvieron estables a pesar de los distintos tratamientos de humedad recibidos. Estos resultados difieren con los de Myachoti y col., (1995), que reportan disminución de las concentraciones de taninos por la humedad de los ensilajes de granos de sorgo. En este mismo sentido, Russell y Lolley (1989), sostienen que el efecto de la humedad del grano reconstituido, además de la hidrólisis de urea agregada aumentando la alcalinidad, son factores que intervienen en la desactivación de los taninos. La humedad, al disminuir la concentración de taninos en los granos de sorgo, llevaría a una menor formación de complejos proteína-tanino, lo que dificultaría la disponibilidad de almidón. De este modo se mejoraría el valor nutritivo de los granos de sorgo para la alimentación animal (Mitaru y col., 1984; Stock y Mader, 1987).

Los genotipos AT mostraron un descenso pronunciado de las concentraciones de TC ( $p = < 0,01$ ; SEM = 0,07) luego del ensilaje en los microsilos experimentales. Al día 0 promediaron 0.78% de TC, mientras que a los 180 días del ensilaje promediaron 0.25% de TC. Las muestras BT se comportaron de forma más estable durante el ensilaje, sin mostrar diferencias significativas. Esto podría deberse a las bajas concentraciones de taninos en las muestras iniciales. Similar disminución de la concentración de TC se observó en las muestras obtenidas de los silo-bolsa elaborados a partir de las chacras donde se colectaron las muestras iniciales de este experimento (Basilio y Orihuela, 2012).

Los granos de sorgo evaluados en nuestro experimento estaban quebrados, lo que podría explicar en parte la disminución de los TC. Según Chibber y col. (1978), el quebrado previo de los granos que se realiza comúnmente en la confección de silo-bolsas disminuye los TC. En este proceso se remueve el pericarpio y la testa, sitio donde se ubican los TC, lo que explicaría su reducción (Domanski y col., 1997).

La disminución de la concentración de taninos en los microsilos de nuestro experimento, se debería al proceso fermentativo del ensilaje en sí y no al efecto de la humedad. Otros autores, observaron que durante el ensilaje, la concentración de TC se reduce significativamente (Cummins, 1971; Borges, 1995). Según Mc Sweeney y col. (2001), este descenso estaría dado por las condiciones de bajo pH y anaerobiosis del ensilaje en sí.

Al comparar muestras entre productores, se encontró que las concentraciones de uno de los genotipos BT, eran significativamente más bajas, coincidiendo con agregado de inoculante al inicio del ensilaje. El inoculante agregado contenía *L. plantarum*, esto probablemente afectó las concentraciones de TC en estos microsilos.

## Experimento 2

En este experimento, la disminución de la concentración de TC por el agregado de un inoculante comercial podría deberse a reacciones químicas entre los taninos y el inoculante. El inoculante comercial agregado en este experimento, *L. plantarum*, podría presentar tanasas, como se describen en algunas cepas aisladas de esta bacteria (Nishitani y Osawa, 2003; Nishitani y col., 2004; Vaquero y col., 2004). Esta acción enzimática podría ser la responsable de la disminución en la concentración de TC de los microsilos tratados con inoculante.

Las tanasas catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces presentes en los taninos hidrolizables (Rodríguez y col., 2009). Akroum y col. (2009), estudiaron la degradación de los TC en plantas por actividad de tanasas producidas por hongos. Para confirmar si existen tanasas en el inoculante comercial administrado y medir la actividad enzimática, se deberían hacer nuevos estudios siguiendo esa línea.

## CONCLUSIONES

Los diferentes tratamientos de humedad, no afectaron las concentraciones de TC de granos de sorgo de genotipos altos y bajos en taninos, ensilados durante 180 días en microsilos experimentales.

El nivel de humedad con que fueron ensilados los granos evaluados en este trabajo, no resultó ser un factor importante para modificar la concentración de TC.

El proceso de ensilaje en los microsilos experimentales disminuyó la concentración de TC de las muestras de genotipos AT.

La utilización de un inoculante comercial con *L. plantarum*, disminuyó la concentración de TC en los granos de sorgo ensilados durante 180 días en microsilos experimentales.

El agregado de inoculante con *L. plantarum*, resultó ser un método efectivo para disminuir la concentración de TC. Su uso podría tener gran implicancia práctica al momento del ensilaje, principalmente en sorgos de genotipos AT.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aguilar CN, Gutiérrez-Sánchez G. (2001). Review sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Sci. Technol. Internat.* 7: 373-382.
- 2) Akroum S, Haddi ML, Lalaoui K. (2009). Fungal tannase degrading condensed tannins of *Camellia sinensis* and measure of the enzyme activity on Quebracho. *Middle East J Sci. Res.* 4(4): 237-241.
- 3) Andrade R, Mohamad L. (2010). Estrategias para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilaje. *Producir XXI, Bs. As.*, 18(219):58-62.
- 4) Barrera EM, López JA, Calva DS, Gonzalez EA, Wagner N. (1998). Efecto de la adición de diferentes niveles de DL-metionina en dietas con sorgo con contenido alto y bajo en taninos, sobre el comportamiento productivo de gallinas de postura. *Vet Méx*, 29(1): 29.
- 5) Barry TN, Manley TR, Duncan SJ. (1986). The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. *Br J Nutrition.* 55:123-137.
- 6) Basilio D, Orihuela JJ. (2012). Dinámica de los taninos condensados en cuatro genotipos de sorgo y su efecto en el tiempo y el desarrollo fúngico. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay. 48 p.
- 7) Bennnett WF, Tucker B. (1986). Producción moderna de sorgo granífero. Hemisferio Sur.
- 8) Beta T, Rooney LW, Marovatsanga LT, Taylor JRN. (2000). Effect of chemical treatments on polyphenols and malt quality in sorghum. *J. Cereal Sci.* 31:295-302.
- 9) Borges A. (1995). Qualidade de silagens de híbridos de sorgo de porte alto, com diferentes teores de tanino e de umidade no colmo, e seus padrões de fermentação. Tesis de maestria: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 104p.
- 10) Carámbula M. (2007). Verdeos de verano. Montevideo, Hemisferio Sur 226p.
- 11) Chalkling DJ, Brasesco R. (1997). Silo de grano húmedo una alternativa promisoría. *Rev. Plan Agrop.* 25(76):22-26.
- 12) Chessa Fuente A, (2007). La calidad del sorgo como alimento animal. *Marca Liq. Agrop* 17. (169):65-68.

- 13) Chibber BA, Mertz ET, Axtell JD. (1978). Effects of dehulling on tannin content, protein distribution, and quality of high and low tannin sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 679-683.
- 14) Colazo J, Garay J, Veneciano J. (2012). El cultivo de sorgo en San Luis. Villa Mercedes, San Luis (AR): INTA Estación Experimental Agropecuaria San Luis. *Información Técnica* No. 183, 117 p.
- 15) Contreras-Govea EF, Marsalis AM, Lauriault ML. (2009). Inoculantes microbiales para ensilaje: Su uso en condiciones de clima cálido. New Mexico State university. Servicio de Extensión Cooperativa. Facultad de Ciencias Agrarias, Ambientales y del Consumidor Circular, 642, 1-8.
- 16) Coria ML. (2011). Calidad de sorgos según tipo y momentos de corte. Disponible en: [http://inta.gob.ar/documentos/calidad-de-sorgos-segun-tipo-y-momentos-de-orte/at\\_multi\\_download/file/1.%20calidad\\_sorgo\\_según\\_tipo\\_y\\_corte.pdf](http://inta.gob.ar/documentos/calidad-de-sorgos-segun-tipo-y-momentos-de-orte/at_multi_download/file/1.%20calidad_sorgo_según_tipo_y_corte.pdf)  
Fecha de consulta: 10/03/2014.
- 17) Cummins DG. (1971). Relationship between tannin content and forage digestibility in sorghum. *Agron J* 63:500-502.
- 18) Curbelo AR. (2010). Ensilaje de grano de sorgo con diferente contenido en taninos: efecto sobre la composición química, degradabilidad ruminal, digestibilidad intestinal y fermentescibilidad. Tesis Magister en Ciencias Agrarias, Orientación Ciencia Animal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Uruguay. 99 p.
- 19) D' Mello JPF. (1992). Chemical constraints to the use of tropical legumes in animal nutrition. *Anim Feed Sci Technol*. 38:237-261.
- 20) Da Silveira Agostini-Costa T, Lima A, Lima MV. (2003). Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. *Química Nova*, 6, 763-765.
- 21) DIEA. (2014). Anuario estadístico agropecuario 2014. Disponible en: [www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2.diea,diea-anuario-2014](http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2.diea,diea-anuario-2014). Fecha de consulta: 10/03/2014.
- 22) Domanski C, Giorda LM, Feresin O. (1997). Composición y calidad del grano de sorgo EEA INTA Manfredi, Arg., Cuaderno de Actualización N° 7, 47-50.
- 23) Duodu K, Taylor J, Belton P, Hamaker B. (2003). Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 38: 117-131.
- 24) Evers AD, Blakeney AB, Brien LO. (1999). Cereal structure composition. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 629-650.
- 25) FAO-IAEA. (2000). Quantification of tannins in tree foliage-a laboratory manual, working doc, Vienna, Austria.

- 26)FAO-IAEA. (2001). Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/x8486s/x8486s04.htm> Fecha de consulta: 21/05/2014.
- 27)Fernández Mayer AE. (2006). La calidad nutricional de los alimentos y su efecto sobre la producción de carne y leche. Serie didáctica INTA, (8).
- 28)Gil CH, Eusse JB. (2000). El Ensilaje en la alimentación del ganado vacuno. Bogotá. Tercer Mundo, 18 p.
- 29)Hagerman AE. (1992). Tannin protein interactions. In ACS Symposium Series (Vol. 506, pp. 236-247). 1155 16TH ST, NW, Washington, DC 20036: Amer Chemical Soc.
- 30)Hibberd CA, Wagner RL, Schemm ED, Mitchell Jr, Hintz RL, Weibel DE. (1982). Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grains. J. Anim. Sci. 55: 665-672.
- 31)Hill TM, Schmidt SP, Russell RW, Thomas EE, Wolfe DF. (1991). Comparison of urea treatment with established methods of sorghum grain preservation and processing on site and extent of starch digestion by cattle. J. Anim. Sci. 69: 4570-4576.
- 32)Huck GL, Kreikemeier KK, Bolsen KK. (1999). Effect of reconstituting field-dried and early-harvested sorghum grain on the ensiling characteristics of the grain and on growth performance and carcass merit of feedlot heifers. J. Anim. Sci. 77:1074-1081.
- 33)Kotarski SF, Waniska RD, Thurn KK. (1992). Starch Hydrolysis by the ruminal microflora J. Nutr. 122:178-190.
- 34)Martin OG. (2005).Cultivos: Sorgos forrajeros. La nueva generación. Disponible en: [http://www.produccion.com.ar/2005/05ago\\_11.htm](http://www.produccion.com.ar/2005/05ago_11.htm) .Fecha de consulta: 19/06/11.
- 35)Martin JS, Martin MM. (1982). Tannin assays in ecological studies: lack of correlation between phenolics, proanthocyanidins and protein-precipitating constituents in mature foliage of six oak species. Oecologia, 54(2): 205-211.
- 36)Maxson WE, Shirley RL, Bertrand JE, Palmer AZ. (1973). Energy values of corn, bird resistant and non-bird resistant sorghum grain in rations fed to steers. J. Anim. Sci. 37: 1451-1457.
- 37)Mc Donald P, Henderson R, Heron SJE. (1991). The Biochemistry of Silage. 2a. ed. Marllow. Chalcombe Publications. 33p

- 38)Mc Sweeney CS, Palmer B, McNeill DM, Krause DO. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Sci. Technol.* 91(1): 83-93.
- 39)Mitaru BN, Reichert RD, Blair R. (1984) Kinetics of tannin deactivation during anaerobic storage and boiling treatment of high tannin sorghum. *J. Food Sci.* 49: 1566-1568.
- 40)Molinari MLC, Antunez APO. (2005) Efecto del método de conservación de distintos materiales de sorgo sobre la degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de la materia seca. Facultad de Agronomía. Universidad de la República Uruguay. 68 p.
- 41)Montiel MD, Elizalde JC. (2004). Degradabilidad ruminal de silajes de grano húmedo de maíz y de sorgo con diferentes contenidos de taninos. Congreso Argentino de Producción Animal XXVI. Tandil, Argentina. p 1-20.
- 42)Muller-Harvey I, McAllan AB. (1992). Tannins: their biochemistry and nutritional properties. En: M. Morrison (ed) *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*. London, JAI Press, V. 2, pp 151-217.
- 43)Myachoti CM, Atkinson JL, Lesson S. (1995). Sorghum tannins: a review. *World's Poultry Sci.* 53: 5-21.
- 44)Neucere, NJ, Jacks TJ, Sumrell G. (1978). Interactions of globular proteins with simple polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 26(1):214-216.
- 45)Nishitani Y, Osawa R. (2003). A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. *Journal of Microbiol. Meth.* 54, 281–284
- 46)Nishitani Y, Sasaki E, Fujisawa T, Osawa R. (2004). Genotypic analyses of lactobacilli with a range of tannase activities isolated from human feces and fermented foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:109–117.
- 47)Otero MJ, Hidalgo LG. (2004). Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales. *Livestock Res Rural Development*, 16(2): 1-9.
- 48)Porter LJ, Liana N, Hrstich, Bock G, Chan. (1985).The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding sns delphinidin. *Phytochemistry.* 25(1): 223-230.
- 49)Ramírez SJL, Araque CAC. (1998). Evaluación fisiológica y nutricional del efecto de los taninos en los principales sorgos graníferos (*Sorghum bicolor* (L) moench) cultivados en Colombia. Disponible en: [http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos\\_naturales/taninos\\_2.pdf](http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos_naturales/taninos_2.pdf). Fecha de consulta: 20/05/2015.
- 50)Reed JD. (1995). Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *J Anim Sci.* 73:1516-1528.

- 51)Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, de las Rivas B, de Felipe FL, Gómez-Cordovés C, Muñoz R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International J Food Microbiol.* 132(2): 79-90.
- 52)Romero Lara CE, Palma Garcia JM, López J. (2000). Influence of grazing on the concentration of total phenols and condensed tannins in *Gliricidia sepium* in the dry tropics. *Livestock Res Rural Development*, 12(4): 1-10.
- 53)Russell W, Lin JCM, Thomas EE, Mora EC. (1988). Preservation of high moisture milo with urea: grain properties and animal acceptability. *J Anim. Sci.* 66: 2131-2139.
- 54)Russell W, Lolley JR. (1989). Desactivation of tannin in high tannin milo by treatment with urea. *J Dairy Sci.* 72: 2427-2430.
- 55)Russell W, Schmidt SP. (1993). Preservation of high moisture grain sorghum with urea and evaluation in cattle feeding. *West Virginia Univ. And Auburn Univ. 18th Biennial Grain Sorghum Research and Utilization Conference*, 9pp.
- 56)Scarpitta N. (2008). ¿Qué necesitamos conocer sobre el silo de grano húmedo de sorgo? Disponible en: [http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R126/R\\_126\\_48.pdf](http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R126/R_126_48.pdf)  
Fecha de consulta: 30/04/2014.
- 57)Stock RA, Mader T. (1987). Grain processing for beef cattle. Disponible en: <http://www.ianr.unl.edu/pubs/beef/g136.htm>. Fecha de Consulta: 15/12/2013.
- 58)Streeter MN, Wagner DG, Hibberd CA, Owens FN. (1990). The effect of sorghum grain variety on site and extent of digestion in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 68:1121-1132.
- 59)Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB, Barry TN. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58: 321-329.
- 60)Vaquero I, Marcobal A, Muñoz R. (2004). Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 96:199–204.
- 61)Waniska RD. (2000). Structure phenolic compounds, and antifungal proteins of sorghum caryopses. *Proceeding of an international Consultation, Technical and Institutional Options for Sorghum Grain Mold Management: 18-19 May 2000, ICRISAT, Patancheru, India.* p.72-106.