

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“DINÁMICA DE LOS TANINOS CONDESADOS EN CUATRO GENOTIPOS  
DE SORGO Y SU EFECTO EN EL TIEMPO Y EL DESARROLLO FÚNGICO”**

**por**

**BASILIO SANTURIO, Déborah Magdalena  
ORIHUELA BARUSSO, Juan José**

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

**MODALIDAD: Ensayo experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2012**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

**Presidente de Mesa:**

.....  
**Dr. José Luis Repetto**

**Segundo Miembro (Tutor):**

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

**Tercer Miembro:**

.....  
**Dr. Alejandro Britos**

**Cotutor:**

.....  
**Dra. Alicia Félix**

**Fecha: 15/11/2012**

**Autores:**

.....  
**Déborah Basilio Santurio**

.....  
**Juan José Orihuela Barusso**

## AGRADECIMIENTOS

- A nuestra tutora la Dra. Carmen García y Santos por su apoyo, orientación y disposición. Como al personal de la cátedra de Toxicología de la Facultad de Veterinaria.
- A nuestra co-tutora, Alicia Félix por sus aportes.
- Al Departamento de Nutrición, por el préstamo de materiales y consultas en este trabajo.
- Al Dr. Gonzalo Suarez por sus aportes y disposición.
- A nuestras familias y amigos, por su apoyo incondicional y ayuda en todo momento.
- Al Laboratorio de Micología (Facultad de Ciencias- Facultad de Ingeniería de la República Oriental del Uruguay).
- A La barra de Producción 2010, por tantos buenos momentos vividos.
- A la Facultad de Veterinaria por la posibilidad de formarnos en esta linda y grata profesión.
- A los productores por su disposición y colaboración para la toma de muestras.
- Al Programas de Financiación de Posgrados de Facultad de Veterinaria y Proyecto CSIC Vínculo Sector Productivo CONAPROLE.

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

### Cuadros

<b>Cuadro I.</b> Origen y características de los sorgos utilizados en el experimento.	25
<b>Cuadro II.</b> % MS para cada productor en los cuatro tiempos de muestreo.	32
<b>Cuadro III.</b> Contaminación de hongos totales y por género para cada productor.	35

### Figuras

<b>Figura 1.</b> Cultivo de Sorgo Forrajero.	9
<b>Figura 2.</b> Estructura del Grano de Sorgo: corte transversal del grano de sorgo con y sin testa pigmentada presente.	11
<b>Figura 3.</b> Extracción de muestras de silo-bags realizadas mediante calador.	26
<b>Figura 4.</b> Muestras ya secas y colocadas en desecador.	27
<b>Figura 5.</b> Molienda de la muestra de silo de sorgo.	27
<b>Figura 6.</b> Vorteadado de la muestra.	28
<b>Figura 7.</b> Centrífuga con las muestras.	28
<b>Figura 8.</b> Sonificador en funcionamiento.	28
<b>Figura 9.</b> Tubos con la muestra lista para ser filtradas.	28
<b>Figura 10.</b> Balones con la extracción de los taninos condensados.	29
<b>Figura 11.</b> Muestras en la fase de Baño María.	29
<b>Figura 12.</b> Muestras prontas para ser medidas en espectrofotómetro	29
<b>Figura 13.</b> Medición de taninos en espectrofotómetro.	30
<b>Figura 14.</b> Dinámica de la concentración de taninos condensados en función del tiempo de ensilaje para cada productor.	33
<b>Figura 15.</b> Gráfica de los géneros aislados de <i>Aspergillus</i>	34

## 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>
CULTIVO DE SORGO .....	9
CLASIFICACIÓN DEL CULTIVO DE SORGO .....	10
ESTRUCTURA DEL GRANO DE SORGO .....	11
COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL GRANO .....	12
FORMACIÓN DEL COMPLEJO TANINO- PROTEÍNA .....	13
CUANTIFICACIÓN DE TANINOS.....	14
TANINOS CONDENSADOS: VENTAJAS Y DESVENTAJAS .....	15
MÉTODOS DE DESACTIVACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS .....	17
EL ENSILAJE COMO MÉTODO DE CONSERVACIÓN DEL ALIMENTO.....	18
MICROFLORA DEL ENSILAJE .....	19
PRINCIPALES GÉNEROS DE HONGOS DE INTERÉS PECUARIO .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
% MS DE LOS ENSILAJES DE GRANO HÚMEDO DE SORGO .....	32
CONCENTRACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS .....	32
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS TOXICOGÉNICOS .....	33
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>40</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>46</b>

## RESUMEN

Los taninos condensados (TC) son compuestos fenólicos que en cultivos de sorgo aportan características protectoras, variando su efecto de acuerdo a la proporción en que se encuentren. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la evolución de las concentraciones de TC en ensilajes de granos húmedos de sorgo almacenados en silo-bags, a diferentes tiempos de conservación, y su relación con la contaminación fúngica de los principales géneros toxicogénicos de interés pecuario. Se obtuvieron muestras de silos de grano húmedo de sorgo de cuatro establecimientos lecheros comerciales, dos con genotipo alto en taninos (ATC) y dos con genotipo bajo en taninos (BTC). Los muestreos (n=16) se realizaron al momento del ensilaje (día 0) y a los 30, 90 y 180 días del proceso. La concentración de TC en % de materia seca (MS), se determinó mediante despolimerización oxidativa en butanol-HCl por espectrofotometría (550 nm). Para el estudio micológico se sembraron granos de sorgo en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) a pH 4, incubadas 5 a 10 días a 25 °C. El análisis estadístico se realizó mediante un modelo lineal mixto, considerando como efecto fijo: grupo (ATC y BTC), tiempo e interacción grupo-tiempo. Al día 0 el grupo ATC presentó valores de concentración de 0,70 % TC y el grupo BTC de 0,06 % TC. A lo largo del tiempo de almacenamiento (180 días), la concentración de TC en el grupo ATC descendió, a diferencia del grupo BTC en el cuál se mantuvo constante ( $P < 0,05$ ). A los 180 días el grupo ATC presentó valores superiores de concentraciones (0,21 % TC) a los registrados en el grupo BTC (0,03 % TC) ( $P < 0,05$ ). Todos los ensilajes de grano húmedo de sorgo presentaron en algún momento aislamiento de hongos toxicogénicos. Más del 50 % de las especies de *Aspergillus*, correspondieron *A. flavus*. Su incidencia aumentó a los 30 días de almacenamiento y a partir de los 90 días disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ). Las especies de *Fusarium* identificadas con mayor frecuencia fueron *F. nygamai* (44,2 %) y *F. graminearum* (36,5 %). La dinámica de los TC en granos húmedos de sorgo durante el tiempo de almacenamiento en el ensilaje, es dependiente de los valores iniciales de TC al momento de su elaboración. Los perfiles de contaminación fúngica fueron diferentes independientemente de los niveles de TC de los silo-bags estudiados.

## SUMMARY

Condensed tannins (CT) are phenolic compounds which provide protective characteristics to sorghum, when they are located in the plant, and their effects depend on the proportion in which they are found. This work studies the evolution of CT concentrations in high moisture wet grain sorghum stored in silo-bags at different storage times, and their relation to fungal contamination of the main toxigenic genres in our agriculture. Samples were obtained from grain sorghum silos of four different commercial dairy farms. In two of them it was found the high tannin genotype (HCT) sorghum and in the other two the low tannin genotype (LCT) was found. The samples ( $n = 16$ ) were taken at the time of ensiling (day 0) and at 30, 90 and 180 days. The concentration of TC (% DM) was determined by oxidative depolymerization in butanol-HCl and measured spectrophotometrically (550 nm). For mycological study sorghum grains were sown in Petri dishes with potato dextrose agar medium (PDA) at pH 4 and incubated during 5-10 days at 25 °C. Statistical analysis was performed using a linear mixed model, considering as fixed effects: group (HCT and LCT), time and group-time interaction. At day 0 HCT group showed concentrations of 0,70 % CT and LCT group showed values of 0,06 % CT. During the storage time (180 days) HCT group significantly decreased, however the LCT group remained with similar values to day 0 ( $P < 0,05$ ). At 180 days the HCT group showed higher concentration values (0,21 % CT) than those recorded in the LCT group (0,03 % CT) ( $P < 0,05$ ). All wet silage sorghum grain at some point had toxigenic fungi isolation. Over 50 % of the species of *Aspergillus* identified corresponded to *A. flavus*. Its incidence increased after 30 days of storage and then after 90 days it significantly decreased ( $P < 0,05$ ). *Fusarium* species most frequently found were *F. nygamai* (44,2 %) and *F. graminearum* (36,5 %). The dynamics of CT in high moisture sorghum grain during storage time in silo-bags depend on the initial values of CT at preparation time. Fungal contamination profiles were different independently of the level of CT of the silo-bags studied.

## INTRODUCCIÓN

La mayor demanda de productos de origen animal y sus derivados a nivel mundial en los últimos años, ha traído una intensificación en los sistemas productivos, tanto a nivel agrícola como ganadero. Esta realidad no es ajena a nuestro país y hace cada vez más difícil satisfacer las necesidades energéticas de los animales de producción con utilización de pasturas como única fuente de alimento durante todo el ciclo productivo. Esto lleva a un incremento en la elaboración de reservas de alimento para cubrir dichas necesidades (Meireles y Riet-Correa, 1993).

Una de las estrategias tecnológicas aplicadas para dar respuesta a estas demandas, es la utilización de granos y/o ensilajes que aporten energía para balancear dietas, complementando o sustituyendo las pasturas naturales cuando estas son escasas. Es así que en Uruguay, en los últimos años se ha visto incrementado el uso de ensilaje de grano húmedo como suplemento. Esto permite una conservación por más tiempo sin pérdidas en la calidad nutricional (Chalkling y Brasco, 1997).

Entre los granos más utilizados en la alimentación del ganado, se encuentran el maíz y sorgo. El uso de este último se ha incrementado, en parte debido al precio favorable en relación a otros cereales, básicamente el maíz y por sus características de cultivo. El área de siembra destinada al sorgo, ha aumentado en los últimos años. La superficie destinada al cultivo de sorgo de acuerdo a los datos del anuario 2010 fue de 35.000 hectáreas (DIEA, 2010).

El ensilaje de sorgo presenta varias ventajas al de maíz como pueden ser, menores costos de producción, mayor tolerancia a la sequía, mejor capacidad de recuperación luego de largos períodos de sequía y mayor producción de materia seca bajo estas condiciones (Araújo y col., 2002).

Otra característica favorable del cultivo de sorgo es la presencia de taninos, compuestos fenólicos que le confieren ventajas agronómicas respecto a otros cultivos. Entre estas se destacan su resistencia al ataque de aves, insectos y a la contaminación fúngica previo a la cosecha (Magalhaes y col., 1997).

Uno de los principales problemas del uso de ensilajes de grano húmedo de sorgo, es que la calidad del producto final guarda una alta relación con su proceso de elaboración, siendo este un punto crítico de control donde muchas veces suele contaminarse el silo. En el presente trabajo nos planteamos el estudio de la concentración de taninos condensados (TC) en relación al tiempo de conservación y a las poblaciones fúngicas presentes en diferentes variedades de sorgo. Esto permitirá ofrecer una herramienta más a la hora de elegir una variedad de sorgo y el manejo posterior de esta reserva.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Cultivo de Sorgo

El sorgo es una gramínea de origen tropical, adaptado en diversas partes de mundo a través de programas de mejoramiento. Se cultiva ampliamente en zonas de clima templado y es uno de los granos con mayor uso en la alimentación animal y humana (Chessa, 2001). Su ciclo es anual o bianual, presentando alturas de 0,5 hasta los 4 m dependiendo de la especie. Sus cañas presentan un diámetro que varía desde 1 – 1,5 cm, con panoja densa y granos de forma elíptica de color blanco, castaño claro o rojizo (Gallo, 1987).



**Figura 1.** Cultivo de Sorgo Forrajero

Esta gramínea surge como alternativa forrajera debido a sus particularidades como especie C4, que le confiere mayor eficiencia fotosintética. Es muy resistente a la deshidratación por su sistema radicular fibroso y muy extenso que puede alcanzar hasta 1,5 m de profundidad. Tiene una baja relación de transpiración, expresada como kilos de agua requeridos para producir un kilo de materia vegetal. Posee además la habilidad de permanecer en dormancia durante sequías y luego reanudar su crecimiento (Bennett y Tucker, 1986).

Según la Asociación de Productores de Sorgo de los EUA (2003), sería el quinto cereal en importancia a nivel mundial y el tercero en el flujo internacional de granos forrajeros, con el 7 % del total, sólo superado por el maíz y la cebada, con el 72 % y 17 % respectivamente. Durante la segunda mitad del siglo XX, la superficie sembrada de sorgo en el mundo se incrementó en un 60 %, con un aumento en la producción del 244 % (FAO, 1995).

El aumento de la producción de sorgo se relacionaría a la necesidad de: incorporar materia orgánica a suelos degradados y, mejorar rendimientos de cultivos y al creciente uso del mismo como ensilajes de planta entera, grano húmedo y concentrado para la alimentación animal (Díaz y col., 2007).

En la actualidad existe una gran variedad de sorgos en el mercado, ya sea del tipo forrajero o granífero y sus respectivos híbridos, los cuales se diferencian por la duración del ciclo y la presencia o no de TC en el grano entre otros (Chessa, 2001).

## **Clasificación del Cultivo de Sorgo**

### **Según el objetivo de producción**

La elección del tipo de sorgo va a depender del objetivo de producción, agrupando los sorgos ya sea para: a) Pastoreo directo y fardos, donde se utilizan las variedades de sudán y los híbridos de sudán y b) Ensilaje y grano, son utilizados los híbridos doble propósito graníferos-forrajeros (Carámbula, 2007).

Según Coria (2007) los sorgos se podrían clasificar de acuerdo al tipo en: Forrajero, Doble Propósito (DP), Sileros y Graníferos.

**Forrajeros:** se utilizan como una fuente de verdeo de verano, con elevadas producciones de materia seca, alta capacidad de rebrote, macolladores y con baja proporción de grano (menos del 10 % de la planta entera). A su vez dentro de este grupo, los sorgos pueden presentar características que los diferencian y permiten agruparlos en:

-Sudán: sorgos más adaptados al pastoreo directo, con alto volumen de forraje por hectárea y de gran capacidad de rebrote y macollaje. Presentan la desventaja de perder rápidamente calidad al encañar.

-Fotosensitivos: se caracterizan por no florecer en estas latitudes debido al extenso periodo vegetativo que presentan (más de 120 días desde emergencia a panojamiento). Esta característica permite el mantenimiento del valor nutritivo, especialmente de la digestibilidad de la planta. Tienen buena aptitud para el pastoreo directo y generan gran volumen de forraje.

-Azucarados, sorgos con alto contenido de azúcar (carbohidratos no estructurales) en caña. Presentan menor velocidad de crecimiento, menor macollaje y rebrote que los sorgos forrajeros tipo Sudán. Desde el punto de vista nutricional presentan alta calidad y palatabilidad, debido al mayor contenido de azúcares y una aceptable producción de grano. Son aptos para el pastoreo directo o la elaboración de reservas como rollo o silaje.

-BMR (Brown Mid Rib, nervadura central marrón), sorgos que gracias a una mutación genética presentan un menor contenido de lignina en hojas y tallos (30 a 60 % inferior al normal). La lignina es un componente de la pared celular totalmente indigestible para los rumiantes, por lo tanto estos sorgos presentan una mayor digestibilidad de la materia seca. Presentan una aceptable producción de grano, y son aptos para el pastoreo directo o para la confección de ensilaje.

**Doble propósito:** son sorgos que mantienen el índice de cosecha de los graníferos pero debido a que son 40-50 cm más altos, más macolladores y foliosos, el rendimiento de materia seca de planta entera es superior a la de los graníferos.

**Sileros:** son una combinación entre sorgos graníferos y forrajeros azucarados, con una aceptable relación hoja-tallo-panoja, que permite generar un buen ensilado, de buena producción de materia seca por hectárea y aceptable calidad intrínseca, dado que en general presentan un alto contenido de azúcares solubles en tallo que favorecen una rápida fermentación del material ensilado.

**Graníferos:** La planta moderna de sorgo granífero es de 0,5 –1,5 m de altura (Bennett y Tucker, 1986). Poseen alto potencial para la producción de grano, con bajo aprovechamiento en pastoreo directo y buena producción de forraje total por hectárea (pasto+ grano). Un 30-65 % del rendimiento de estos sorgos corresponde al componente grano. Algunos de estos presentan buena aptitud para ensilar (DP).

### Según el color de los granos

Teniendo en cuenta el color de los granos este cultivo puede ser clasificado en tres grupos, **Marrones:** de testa pigmentada con alto contenido de TC; **Rojos** y **Blancos:** sin TC (Chessa, 2001).

### Estructura del Grano de Sorgo

La estructura del grano de sorgo se compone fundamentalmente de tres partes (Figura 2): el pericarpio o cobertura del grano, el endospermo o tejido de reserva y el embrión o futura planta. El pericarpio es la parte más externa constituido a su vez de tres partes (epicarpio, mesocarpio y endocarpio). Existe además otra estructura que puede o no estar presente en el grano que se denomina testa. La misma consiste en una capa fuertemente coloreada por debajo del endocarpio, que contiene la mayoría de los TC del grano. Estos últimos aparecen en la testa con la maduración del grano y se observan como una capa continua de color marrón rojizo a violáceo (Domanski y col., 1997).



**Figura 2.** Estructura del grano de sorgo: corte transversal del grano de sorgo con y sin testa pigmentada presente

## Compuestos Fenólicos presentes en el grano

Debido a que el sorgo no presenta una protección para sus semillas, como por ejemplo la chala del maíz o las glumas del trigo y la cebada, la planta de sorgo produce varios compuestos fenólicos con ese fin. Estos compuestos sirven como una defensa química contra pájaros, patógenos y otros competidores. Entre los compuestos fenólicos se destacan los taninos, los mismos son compuestos no nitrogenados, de estructura polifenólica y alto peso molecular (500 a 3000 Dalton) (Magalhaes y col., 1997).

Los taninos pueden ser clasificados en dos grupos: los hidrosolubles con un carbohidrato central con ligadura de ácidos fenólicos carboxílicos y los condensados que son una mezcla de polímeros flavonoides (Van Soest, 1994). Ambos grupos de taninos (hidrolizables y condensados) son muy reactivos debido a la gran cantidad de hidroxilos fenólicos que poseen (Reed, 1995).

Todos los sorgos graníferos poseen como constituyentes de sus granos, sustancias tánicas hidrolizables (ácido gálico y ácido elágico), las cuales no representan un factor negativo al considerar su valor biológico. Solo los sorgos con testa pigmentada, poseen TC (catequinas, flavonoides y leucoantocianidinas) (Chessa, 2001).

Los TC también llamados proantocianidinas, son polímeros de flavonoides, (3-hidroxi flavonol y/o 3,4 dihidroxi flavandioli) constituidos predominantemente por unidades de leucoantocianidinas. Los precursores necesarios para la síntesis de los flavonoides (estructura básica de los taninos), son el acetato y la fenilalanina que se originan del metabolismo de los carbohidratos y las proteínas respectivamente (Ribero-Pereira y col., 2007).

Jansman (1993) afirmó que los TC no son afectados por enzimas, pero se descomponen al ser tratados con ácidos, formando pequeñas cantidades de antocianidinas, siendo clasificados como proantocianidinas.

## Formación del complejo Tanino- Proteína

La principal característica de los TC es la habilidad que poseen de interactuar con las proteínas. Esto no ocurre con los taninos hidrolizables, que son rápidamente degradados en grupos fenólicos más pequeños incapaces de reaccionar con las proteínas del medio (Hagerman y col., 1992). Según Mangan (1988), además de poder unirse a las proteínas los TC tienen la capacidad de unirse a polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa y pectinas (Kumar y Vaithyanathan, 1990).

La asociación de taninos con proteínas y la estabilidad de este complejo se debe sobre todo a la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre esas moléculas. Las proteínas difieren enormemente en cuanto a la afinidad con los taninos, siendo las principales características que influyen positivamente en esta asociación: el alto peso molecular, la estructura más abierta y flexible, el punto isoeléctrico y el contenido de prolina. Esta última es la más importante ya que posee características hidrofóbicas y contribuye a la formación más abierta de la molécula de proteína (Magalhaes y col., 1997). En cantidades suficientes es la responsable de la estructura tridimensional y la flexibilidad de la molécula, favoreciendo así la fijación de los taninos sobre sus diferentes grupos (Zimmer y Cordesse, 1996).

El complejo tanino - proteína es pH dependiente: los puentes de hidrogeno entre tanino y proteína se rompen a  $\text{pH} < 3,5$ , disociándose el complejo en condiciones de medio ácido como las que se encuentran en el abomaso y primeras porciones del duodeno de los rumiantes (Reed, 1995). Bajo condiciones alcalinas los taninos pierden su capacidad de unirse a las proteínas, porque se promueve una polimerización de los taninos, que conduce a la formación de polímeros más grandes y no reactivos con las mismas (Makkar y Singh, 1993; Makkar y Becker, 1996).

Entre otros factores que influyen en la formación de estos complejos se encuentra la presencia de iones inorgánicos, la cual afecta positivamente la formación de los mismos, (Pérez-Maldonado y col., 1995) demostraron que la presencia de estos iones fue esencial para la formación de complejos tanino-proteína en el líquido ruminal. La fuerza iónica y la fuerza de unión hidrofóbica del complejo también se ve favorecida con la temperatura (Oh y col., 1980 citado por Huyghe y Bayourthe, 2010)

## Cuantificación de Taninos

Los métodos para la cuantificación de los taninos pueden ser basados en las propiedades químicas de los mismos o su capacidad de unirse a diversos sustratos, especialmente las proteínas (FAO – IAEA, 2000). A continuación se citan brevemente los diferentes métodos por los cuales pueden ser cuantificados:

### Métodos Químicos

a) Determinación de fenoles totales: este método se basa en el hecho de que los fenoles son sustancias reductoras. Cabe destacar que todos los taninos son fenoles, pero no todos los fenoles son taninos.

b) Determinación taninos totales: es en parte químico, basado en las propiedades reductoras de los taninos y físico ya que los mismos son medidos como la reducción de los fenoles totales, que ocurre al agregar un agente de unión como polivinilpolipirrolidona (PVPP).

c) Determinación de TC: está basada en la despolimerización oxidativa que sufren los TC en butanol-HCl. La presencia de un agente férrico es utilizada para aumentar la reproductibilidad y sensibilidad de la prueba (Porter y col., 1985; Magalhaes y col., 1997).

d) Determinación de Gallotaninos: toma en cuenta la hidrólisis de los gallotaninos hasta ácido gallico en condiciones ácidas.

### Métodos de unión-precipitación de proteínas

a) Determinación de los fenoles que precipitan las proteínas: se fundamenta en la formación de complejo tanino-proteína (tanino extraído de la planta y la proteína albumina sérica bovina).

b) Ensayo del papel de filtro - Ponceau: Los complejos tanino-proteína sobre el papel de filtro son coloreados usando el colorante de Ponceau.

c) Difusión radial: las moléculas de tanino migran a través de un gel impregnado con proteína (albumina sérica bovina). Los complejos formados en el gel aparecen en forma de anillos los cuales indican la cantidad de complejos formados según su diámetro.

### Métodos Biológicos

El alimento a analizar se coloca en un sistema de fermentación in-vitro con líquido ruminal, en presencia y ausencia de polietilenglicol (PEG), que tiene gran afinidad por los taninos, llegando a romper el complejo tanino-proteína. Luego midiendo la producción de gas y la cantidad de masa microbiana producida en presencia y ausencia de PEG se puede hacer una estimación de la cantidad de taninos presente (FAO – IAEA, 2000).

Como vimos anteriormente existen varios métodos de laboratorio para detectar los taninos o la presencia de granos con testa pigmentada. Pero existe además una forma rápida y relativamente segura que ha sido adoptada por muchos compradores de grano, la misma es la denominada: Prueba de

Blanqueo con cloro, en la cual luego de calentar a baño María los granos con hipoclorito de sodio e hidróxido de potasio los granos con TC tomarán un color oscuro y los que no los poseen un color claro (Chessa, 2001).

## **Taninos Condensados: Ventajas y Desventajas**

### **Ventajas**

Desde el punto de vista agronómico la principal ventaja de estos compuestos es la resistencia a pájaros, importante en ciertas regiones donde puede ocurrir un ataque tan severo que llegue a afectar toda una plantación. Este ataque se observa principalmente cuando el grano se encuentra en estadio de lechoso a pastoso. La resistencia otorgada por los taninos se debe a la astringencia que le otorgan al grano cuando se forman los complejos tanino-proteína precipitando a estas últimas (Magalhaes y col., 1997).

Favorecen también la resistencia a hongos que causan la descomposición del grano antes de su cosecha y que afectan significativamente la producción y la calidad de los granos y semillas. Por lo tanto contribuyen indirectamente a la posible reducción de la concentración de aflatoxinas en la masa del grano. En cuanto a la resistencia a los insectos, se relacionaría con los pulgones, pero solamente en el periodo inicial del crecimiento del sorgo ya que los compuestos fenólicos no poseen control sobre los insectos en los granos almacenados (Magalhaes y col., 1997).

Reducen la germinación precoz de los granos en la panícula que comúnmente ocurre durante periodos prolongados de lluvia después de la maduración fisiológica cuando las altas temperaturas favorecen la germinación. En este caso, el mecanismo de acción de los taninos está relacionado con el efecto de latencia de las semillas, ya que una vez que se encuentra en la testa del grano el tanino puede retardar la absorción de agua atrasando consecuentemente la germinación. Además de esto, los taninos pueden formar complejos e inactivar enzimas implicadas en el proceso de germinación (Magalhaes y col., 1997).

Con respecto al efecto sobre la alimentación de rumiantes se podría decir que los taninos afectan positivamente, ya que los mismos, precipitan las proteínas provenientes de la ingesta, con lo que aumentan su pasaje hacia el intestino delgado donde son absorbidas (Otero e Hidalgo, 2003).

Existen suficientes evidencias que demuestran que los taninos mejoran la producción de carne y lana cuando los animales se encuentran afectados por parasitosis gastrointestinales. Los mecanismos que explicarían la acción de los TC en los animales afectados por parasitosis gastrointestinales pueden ser clasificados como de tipo directo (efecto sobre el parásito en sí mismo) e indirecto (afectan el estado general del individuo y modifican la respuesta del animal a la enfermedad) (Poppi y col., 1986).

Estas mejores ganancias de peso que se obtienen en animales parasitados consumiendo forrajes con TC se atribuyen a una mayor disponibilidad proteica en el intestino, este mismo pasaje de proteínas modificaría el pH del lumen intestinal y consecuentemente se alteraría el establecimiento larval (Kahn y Díaz-Hernández, 2000).

Diversos autores como Abdel y col., (2007), evidenciaron que taninos provenientes de sorgos comerciales tienen una gran actividad antimicrobiana sobre todo para bacterias como *Salmonella typhimurium* y otras Enterobacterias.

## **Desventajas**

Dentro de las desventajas se destaca la de disminuir la digestibilidad del grano, ya que fijan las proteínas del mismo reduciendo su disponibilidad, además de inhibir la acción de la amilasa (enzima clave para la degradación del almidón). En este sentido, pueden provocar una disminución del 10 al 30 % y aún mayor en la eficiencia alimenticia, en comparación con los sorgos que no poseen estos compuestos. Los granos de sorgo de bajo contenido en taninos tienen un valor nutritivo equivalente al 96 a 98 % del grano de maíz. El valor alimenticio de un ensilaje de grano húmedo es equivalente entre sorgo y maíz, especialmente en sorgos sin taninos (Chessa, 2001).

Altas concentraciones de taninos condensados (5-10 % de la MS), deprimen el consumo voluntario y la digestibilidad del forraje. Esto provoca cierta limitación en el uso del sorgo como base en la dieta de los animales, principalmente en los monogástricos (Magalhaes y col., 1997). La disminución en el consumo según Kumar y Vaithiyanathan (1990), se debe a tres fenómenos: en primer lugar porque los taninos son astringentes y por lo tanto menos apetecibles, en segundo lugar, porque disminuyen la degradabilidad de la MS en el rumen (Waghorn y col., 1994, citado por Zimmer y Cordesse, 1996), y por último porque aumentan los niveles relativos de ciertas hormonas peptídicas comunes por la disminución en la ingesta. En este sentido, al disminuir el consumo y la digestibilidad de alimento los taninos afectan negativamente el desempeño productivo de los animales (Reed y col., 1990).

De acuerdo con Kumar y Singh (1984), los alimentos ricos en taninos deben ser ofrecidos con ciertas restricciones ya que pueden provocar una disminución en la producción de leche, disminución en la digestibilidad del azufre, alteraciones tóxico-digestivas en el intestino, hígado, bazo y riñones, con presencia de moco en orina y constipación. Aunque según otros autores, Hibberd y col., (1985) y Josifovich y col., (1987), los rumiantes adaptados a dietas ricas en fenoles, poseen microorganismos capaces de modificar o destruir integralmente estas sustancias, reduciendo considerablemente su toxicidad.

## **Métodos de desactivación de Taninos Condensados**

Existen diferentes métodos para la desactivación de los TC en los granos de sorgo, los mismos pueden ser clasificados en métodos físicos y químicos.

El método físico más utilizado ha sido el descascarado o perlado del grano (Chibber y col., 1978), el cual permite la remoción del pericarpio y de la testa siendo esta última estructura el sitio donde se ubican los TC.

Entre los métodos químicos se destacan el uso de sustancias como el polietilenglicol (PEG) y la urea.

El PEG, es un detergente no iónico, soluble en agua, que forma complejos insolubles con los taninos condensados en un amplio rango de pH (2-8,5), (Jones y Mangan, 1977). Dicha sustancia puede evitar la formación o desplazar a la proteína del complejo proteína-tanino (Silanikove y col., 2001).

La urea también ha sido utilizada para disminuir el efecto negativo de los taninos. Algunos autores indicaron que el tratamiento con urea sobre un grano húmedo de sorgo con alto contenido de taninos, proporciona una adecuada conservación en aerobiosis y además inactiva rápidamente los taninos mejorando la digestibilidad *in vitro* (Russell y Lolley, 1989).

## El ensilaje como método de conservación del alimento

El ensilado es un proceso de conservación químico en el cual, por acción de microorganismos y en ausencia de oxígeno, se producen ácidos que inhiben los procesos de descomposición del forraje. Se cumple a través de varias etapas, que concluyen en 30 a 40 días según el material ensilado (Chiossone y col., 2011).

### Proceso de Ensilado

Este consta de varias etapas, las cuales pueden ordenarse según el tipo de fermentación, el género de microorganismo predominante y el nivel de pH (Scarpitta, 2008) en:

**Fase Aeróbica:** esta fase comprende el periodo cosecha-ensilaje y es determinante de la calidad final del silo. Durante la misma el material es atacado por microorganismos desencadenando procesos de respiración celular que consumen carbohidratos, disminuyendo la calidad del material y afectando el proceso de conservación. Por lo tanto es fundamental que la misma transcurra lo más rápido posible, reduciendo el tiempo entre la cosecha y el llenado del silo.

**Fase de Fermentación Acética:** comienza cuando ha desaparecido el aire del silo y ha bajado el pH, por lo general no se extiende más de 24 a 72 horas.

**Fase de Transición:** cuando el pH ha bajado lo suficiente hasta valores de 5 se inhibe el desarrollo de las bacterias acéticas dando paso al inicio de la fermentación láctica.

**Fase de Fermentación Láctica:** es la más larga de todas y se caracteriza por el desarrollo de bacterias lácticas que producen ácido láctico. Culmina cuando el pH ha bajado hasta valores de 4 a 4,5 donde el desarrollo de bacterias es inhibido estabilizándose el medio.

**Fase Estable:** el pH está bajo y se garantiza la conservación del material.

**Fase de Deterioro Aeróbico:** comienza con la apertura del silo, que lleva paulatinamente al deterioro del mismo. El proceso de deterioro se puede dividir en dos etapas:

- a) Degradación de los ácidos orgánicos por la acción de levaduras y ocasionalmente de bacterias que producen ácido acético. Esto induce un aumento del pH dando lugar a la segunda etapa.
- b) Aumento de temperatura y de la actividad de los microorganismos (mohos y bacterias), con deterioro del ensilaje.

## Clases de silos o almacenaje

El ensilaje es almacenado en una estructura denominada silo, la capacidad del mismo va a estar determinada de acuerdo a las necesidades particulares de cada establecimiento. Las estructuras más utilizadas para almacenar silos son: Silos Torta, Bunker o Silo Malla recubierto en su interior por plástico y Silo-Bolsa (silo-bag) (Chalkling y Brasesco, 1997).

Existen diferentes variantes con respecto al ensilaje, el cual puede realizarse con la planta entera del cultivo y se denominan (silo planta entera), o solo su componente grano, donde se diferencian los de grano húmedo y los de grano seco. En nuestro país el silo de grano húmedo tiene un papel muy importante en la cadena productiva. Este se define como el grano cosechado con una humedad comprendida entre el 23 y el 40 % (siendo el óptimo 28 %), que es conservado sin previo secado en condiciones de anaerobiosis (Chalkling y Brasesco, 1997).

Según Scarpitta, (2008) la utilización de esta tecnología permite hacer un uso más eficiente de las pasturas, fundamentalmente en invierno cuando éstas poseen bajo aporte energético y buen balance de proteínas. De esta manera el ensilaje de grano ayudaría a cubrir esta limitante.

## Microflora del ensilaje

La microflora del ensilaje juega un papel clave para el éxito del proceso de conservación. Puede ser dividida en dos grupos principales; los microorganismos benéficos y los microorganismos indeseables, estos últimos pueden causar deterioro anaeróbico (clostridios y enterobacterias) o aeróbico (levaduras, bacilos, *Listeria* spp y mohos). Estos microorganismos indeseables no sólo reducen el valor nutritivo del ensilaje sino que pueden además afectar la salud de los animales o alterar la calidad de la leche, o ambas, como es el caso de *Listeria* spp, *clostridios*, hongos y bacilos (FAO, 2001).

Los componentes benéficos pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. La mayoría de ellos son mesófilos, por lo tanto pueden crecer en un rango de temperaturas que oscilan entre 5 y 50 °C. Son capaces de bajar el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, dependiendo de las especies y del tipo de forraje. Todos ellos son aeróbicos facultativos, pero muestran cierta preferencia por la condición anaeróbica (Hammes y col., 1992).

## Microorganismos indeseables

**Las levaduras** son microorganismos eucarióticos, anaeróbicos facultativos y heterotróficos. En todo ensilaje, tanto la actividad de levaduras anaeróbicas como aeróbicas son indeseables. Bajo condiciones anaeróbicas las levaduras fermentan azúcares produciendo etanol y CO<sub>2</sub> (McDonald y col., 1991). El etanol no sólo disminuye el azúcar disponible para producir ácido láctico, sino que también produce un mal gusto en la leche. Bajo condiciones aeróbicas, muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, este efecto eleva el valor del pH del ensilaje, lo cual a su vez permite el desarrollo de otros organismos indeseables (Oude Elferink y col., 2001).

**Los clostridios** son bacterias anaeróbicas que forman endosporas. La mayoría de estas enterobacterias que se encuentran en los ensilajes no son patógenas, aunque su desarrollo en el mismo es perjudicial, porque compiten con los integrantes benéficos por los azúcares disponibles. Además pueden degradar las proteínas, disminuyendo el valor nutritivo del ensilaje y creando problemas por la producción de aminas biogénicas que son tóxicas y disminuyen la palatabilidad del ensilaje (Oude Elferink y col., 2001), especialmente en animales no acostumbrados a su sabor.

**Las enterobacterias** no proliferan en ambientes con valores bajos de pH, por lo tanto las técnicas de ensilaje que aseguren un rápido y significativo descenso de este parámetro en el ensilaje, provocarán una inhibición del desarrollo de las enterobacterias (McDonald y col., 1991).

**Bacterias productoras de ácido acético:** son ácido tolerantes y aeróbicas obligatorias. Todas las bacterias aisladas de muestras de ensilaje pertenecen al género *Acetobacter*. La actividad de estas bacterias en el ensilaje es pernicioso porque puede iniciar un deterioro aeróbico al oxidar el lactato y el acetato produciendo CO<sub>2</sub> y agua. Generalmente, las responsables principales del inicio del deterioro aeróbico son levaduras; las bacterias acéticas se encuentran ausentes o juegan un papel poco importante en este problema (Oude Elferink y col., 2001).

**Los bacilos** son bacterias que se asemejan a los *clostridios*, poseen forma cilíndrica y forman esporas. Algunos son capaces de producir sustancias fungicidas, y se los ha usado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes (Phillip y Fellner, 1992). Su desarrollo es indeseable porque no sólo son menos eficaces como productores de ácido láctico y acético comparado con el grupo benéfico, sino que en las etapas finales, incrementan el deterioro aeróbico.

Para disminuir el desarrollo de *Bacillus* en el ensilaje, la temperatura de almacenaje no debería ser muy alta y se deberá minimizar el ingreso de aire. Además se debe reducir toda contaminación inicial del ensilaje con tierra o estiércol (McDonald y col., 2006).

**Listeria:** Los integrantes del género *Listeria* son organismos aeróbicos o anaeróbicos. Con relación a los efectos negativos sobre la calidad del ensilaje, la más importante especie es la *L. monocytogenes*, anaeróbica facultativa, y patogénica para varios animales y para el hombre. Oude Elferink y col., (2001), han señalado que el uso de ensilaje de mala calidad ha sido una de las fuentes principales de contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes*.

## Hongos / Mohos

Los hongos son organismos eucariotas. Su presencia en un ensilaje es fácil de identificar debido a los filamentos de diversos colores y de gran tamaño que producen muchas de sus especies. Se pueden desarrollar en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno, pero si fue realizado correctamente esto ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada. Durante el deterioro aeróbico que es la última etapa del proceso del ensilaje, todo el contenido puede ser invadido por hongos (Mc Donald, 1991)

Se estima que entre el 10 y 30 % de los granos cosechados, dependiendo de la tecnología de almacenamiento y del clima, se pierden debido al deterioro producido por los hongos, muchos de los cuales son productores de micotoxinas (Chelkowski, 1991). La FAO 1999, estima que el 25 % de los granos de cereales y oleaginosas en el mundo están anualmente contaminados con micotoxinas. No sólo disminuyen el valor nutritivo y la palatabilidad del ensilaje sino que también son un riesgo para la salud de los animales y las personas. Las esporas de mohos pueden asociarse a ciertas afecciones pulmonares y reacciones alérgicas (Oude Elferink y col., 2001).

Otros problemas de salud asociados con los hongos se relacionan con las micotoxinas, las cuales son elementos tóxicos elaborados por distintos tipos de hongos que crecen en plantas, henos, silos, granos, subproductos y otros alimentos almacenados. Estas toxinas producen la enfermedad denominada micotoxicosis que se presenta en animales y el hombre. Y dependiendo del tipo y la cantidad de las mismas presentes en el ensilaje, los problemas de salud pueden variar desde ligeras molestias digestivas, pequeños problemas de fertilidad y una disminución de las defensas naturales, hasta serios daños en el hígado, riñones y abortos (Osweiler, 2000).

Los géneros de hongos toxicogénicos en alimentos, como ensilajes, no necesariamente producen gran cantidad de micotoxinas, y la presencia de los mismos no significa producción de estos metabolitos. Además, pueden detectarse micotoxinas y no encontrarse los hongos (Auerbach, 1998).

Para reducir el desarrollo de hongos, las técnicas de ensilaje deben de minimizar el ingreso de aire bajo una excelente compactación y cierre hermético de la reserva. Se pueden utilizar además aditivos que inhiben el deterioro aeróbico, y así poder prevenir o limitar el desarrollo de estos contaminantes (Oude Elferink y col., 2001).

## TIPOS DE HONGOS CONTAMINANTES SEGÚN FAO 2010

### Hongos de campo:

*Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. nivale*)

*Alternaria* sp.

*Helminthosporium* sp.

*Cladosporium* sp.

*Penicillium* (*P. oxalicum*, *P. Funiculosum*, *P. oylopium*, *P. variables*, *P. oydrinum*)

### Hongos de almacenaje:

*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*)

*Penicillium* sp.

### Hongos del deterioro avanzado:

*Chaetomiun* sp.

*Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. fumigates*)

*Scopulariopsis* sp.

*Rhizopus* sp

*Mucor* sp.

*Absidia* sp.

## Principales géneros de hongos de interés pecuario

Dentro de estos se destacan fundamentalmente: los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Osweiler, 2000; Yiannikouris y Jouany, 2002). Los hongos de almacenamiento más importantes corresponden a especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, en cambio las especies de *Fusarium* invaden las plantas fundamentalmente en el campo (D'Mello y col., 1999).

*Aspergillus spp.*, produce diferentes micotoxinas, entre las que se destacan las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, siendo M<sub>1</sub> el derivado metabólico de la B<sub>1</sub>, excretado por leche, y el de mayor significado toxicológico. Las aflatoxinas B<sub>1</sub> y M<sub>1</sub> están clasificadas como carcinógenos grado 1 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC).

Los efectos de las aflatoxinas se observan en diversas especies animales, especialmente animales de granja, bovinos de leche y de carne en confinamiento. Causan importantes pérdidas económicas por disminución de la producción (leche, huevos, carne), menor ganancia de peso y muertes de animales. Además pueden estar presentes en leche y derivados, carne de cerdo o huevos (Colvin y col., 1984). Provocan desde daño agudo de hígado, con necrosis y hemorragias, hasta cáncer hepático, y son teratogénicas e inmunosupresoras (Colvin y col., 1984; Yiannikouris y Jouany, 2002).

Con respecto al género *Fusarium* se destaca que muchas de las especies son fitopatógenas, causando lesiones en tallos y raíces e infecciones en las espigas, lo que provoca graves pérdidas económicas a la producción agrícola (Zinedine y col., 2007). Entre las principales micotoxinas producidas por este género y dependiendo de factores ambientales se encuentran los Tricotecenos: Deoxynivalenol (DON), nivalenol, Toxina T-2 y Diacetoxyscirpenol (DAS); la Zearalenona y las Fumonisinias (Yiannikouris y Jouany, 2002).

Los Tricotecenos causan gran variedad de efectos tóxicos, disturbios gastrointestinales, vómitos, diarrea, rechazo al alimento, aborto y anemia, entre otros (Diekman y Green, 1992; Coulombe, 1993; Osweiler, 2000).

La Zearalenona, actúa como disruptor endócrino en machos y hembras (Osweiler, 2000). Es un contaminante natural de maíz, trigo, cebada, avena, sorgo, henos y ensilajes (Yiannikouris y Jouany, 2002; Zinedine y col., 2007). En bovinos, existen reportes en vacas que presentaron hiperestrogenismo, infertilidad, hipogalactia y disminución de la tasa de concepción, asociados al consumo de diferentes niveles de zearalenona (Weaver y col., 1986a; Weaver y col., 1986b)

Las Fumonisinias B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> están clasificadas por la IARC como posibles carcinógenos humanos (grado 2B) por estar asociadas a cáncer esofágico en humanos y en animales de experimentación. También provocan leucoencefalomalacia equina (Marasas y col., 1988) y edema pulmonar porcino (Harrison y col., 1990).

## OBJETIVOS

### ➤ **Objetivo general**

Estudiar la dinámica de la concentración de taninos condensados en ensilajes de grano húmedo de sorgo de cuatro genotipos de sorgo al momento de la cosecha (día 0) y en tres momentos diferentes de su almacenamiento en silo-bags (30, 90 y 180 días) y su efecto sobre las poblaciones fúngicas presentes.

### ➤ **Objetivos específicos**

Determinar las concentraciones de taninos en cuatro genotipos de sorgos utilizados para silo-bags de grano húmedo, al inicio, a los 30, 90 y 180 días del ensilaje.

Establecer las relaciones existentes entre los niveles de taninos condensados y la producción de los principales hongos toxicogénicos, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

## HIPÓTESIS

El tiempo de almacenaje de ensilajes de grano húmedo de sorgo conservados en los silo-bags muestreados, baja la concentración de TC de los mismos.

Los ensilajes de grano húmedo de sorgo ensilados con alto contenido de TC, tiene menor contaminación de hongos toxicogénicos que los ensilajes de grano húmedo de sorgo con bajo contenido de TC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Las muestras utilizadas para la determinación de los TC fueron extraídas de sorgos destinados a la elaboración de ensilajes de grano húmedo. Las mismas fueron colectadas de 4 establecimientos lecheros remitentes a CONAPROLE de los departamentos de San José y Flores. En el cuadro 1 se pueden ver las fechas de siembra y de cosecha, variedades y características de los sorgos de cada productor.

La colecta se realizó al momento de la cosecha y con los granos con humedades entre 27-32 % según el productor. A los 30, 90 y 180 días del inicio del ensilaje, se visitaron dichos establecimientos para obtener muestras de los silo-bags en estudio.

**Cuadro I.** Origen y variedades de sorgos utilizados en el ensayo, según los niveles de taninos

Productores	Fecha de siembra	Fecha de cosecha	Variedad de sorgo	Nivel de taninos	Lugar
1	11/12/09	01/05/10	Aca 558 Hibrido	Alto	San José
2	02/01/10	10/05/10	Flash 10 Granífero	Bajo	Flores
3	28/12/09	08/06/10	546 Granífero	Bajo	San José
4	27/11/10	12/05/10	Morgan 108 Hibrido	Alto	Flores

Las muestras fueron extraídas utilizando un calador, realizando perforaciones a ambos lados del silo durante todo su trayecto de las zonas altas, media y baja respectivamente (ver figura 3). Cada orificio de perforación fue sellado de forma adecuada con una cinta, para mantener la estabilidad del silo.



**Figura 3.** Extracción de muestras de silo-bags, realizadas mediante calador

En cada extracción se obtuvo una muestra homogeneizada de aproximadamente 5 kg, las cuales se depositaron en bolsas plásticas, identificadas con el nombre de cada productor y la fecha de extracción para luego ser llevadas a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República para su conservación y posterior análisis. En el Laboratorio de Toxicología en conjunto con el Departamento de Nutrición Animal, se realizó la determinación de humedad, pH y cantidad de TC.

Para determinar los TC (proantocianidinas) en los ensilajes de grano húmedo de sorgo se utilizó la técnica de Porter y col., (1985) adaptada por Makkar. Esta se basa en la despolimerización oxidativa de los taninos en butanol-HCl (FAO - IAEA, 2000).

El aislamiento e identificación de hongos lo realizó la Dra. Dinorah Pan en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias - Facultad de Ingeniería. Para esto se tomaron 100 g de cada muestra (congelada) y se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio papa dextrosa agar (PDA) a pH 4. Se incubaron durante 5 a 10 días, con períodos de 12 horas de luz blanca y 12 horas de oscuridad a 25 °C. Aquellas colonias correspondientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* fueron transferidas a medios específicos para su identificación. *Aspergillus* y *Penicillium* en un medio agar extracto de malta (MEA), y PDA para *Fusarium*.

## Procedimientos y determinaciones

### Preparación de la muestra

Las muestras se secaron en estufa a 105 °C por 24 horas hasta llegar a peso constante, para calcular la materia seca (MS), y se mantuvieron en desecador hasta su procesamiento (ver figura 4). Posteriormente como se observa en la figura 5 los granos de sorgo fueron molidos hasta un tamaño de 0,5 mm en un molino eléctrico (Fritsch GMBH Idar – Oberstein, Alemania).



**Figura 4.** Muestras ya secas y colocadas en desecador



**Figura 5.** Molienda de la muestra de silo de sorgo

### Extracción de los taninos condensados

Para la extracción de los TC se pesaron 0,2 g de las muestras con 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 como se ve en la figura 7. Así se eliminan restos de pigmentos y grasa que pudieran contener las muestras secas de modo que el sobrenadante se descartó.

Luego se adicionaron 10 mL de solución de acetona 70 % en los tubos agitando vigorosamente con vórtex (Scientific Industries Genie 2) (ver figura 6), 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) como se muestra en la figura 8. Nuevamente se transfirió el contenido a los tubos (ver figura 9) y se centrifugó 10 minutos más. Los sobrenadantes fueron filtrados y colectados en balones de 25 mL mantenidos en heladera a temperatura aproximada de 4 °C.



**Figura 6.** Vorteadado de la muestra



**Figura 7.** Centrífuga con las muestras



**Figura 8.** Sonicador en funcionamiento



**Figura 9.** Tubos con la muestra lista para ser filtradas

El sedimento sobrante fue tratado un vez más con acetona 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 %, manteniendo nuevamente en heladera. Se puede observar en la figura 10 las diferentes coloraciones de los filtrados.



**Figura 10.** Balones con la extracción de los taninos condensados

Nota: El proceso de extracción realizado para cada silo en cuestión fue repetido para cada momento de análisis (día 0, 30, 90, 180) y fue hecho por duplicado.

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

Para la medición de los TC se tomó una alícuota de 500  $\mu$ L de la extracción refrigerada la cual fue colocada en un tubo de ensayo con rosca y se le adicionó 3 mL de solución de Butanol-HCl (950 mL de butanol más 50 mL de HCl p.p.a) y se agitó vigorosamente (vórtex). Luego se le agregó 250  $\mu$ L de reactivo Férrico (1g de sulfato de amonio férrico en 50 mL de HCl 0,2 N) y se volvió a agitar.



**Figura 11.** Muestras en la fase de Baño María



**Figura 12.** Muestras prontas para ser medidas en espectrofotómetro

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 11. Se midió la absorbancia a 550 nm de longitud de onda utilizando un espectrofotómetro (figuras 12 y 13).



**Figura 13.** Medición de taninos en espectrofotómetro

Los TC (% en la MS) como equivalentes de leucocianidina fueron calculados utilizando la siguiente fórmula:

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

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

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó usando un diseño de medidas repetidas en el tiempo mediante un modelo lineal mixto, con un  $n= 4$ , considerando como efecto fijo: grupo (ATC y BTC), tiempo e interacción grupo-tiempo. Se consideró efectos significativos cuando  $P < 0,05$ .

La incidencia de hongos en las muestras se analizó por el Test de Tukey. Se efectuó un análisis descriptivo del perfil de hongos totales, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* para cada productor.

## RESULTADOS

### % MS de los ensilajes de grano húmedo de sorgo

Cuadro II. % MS para cada productor en los cuatro tiempos de muestreo

	Día 0	Día 30	Día 90	Día 180
Productor	%MS	%MS	%MS	%MS
1	70,2	68,2	97	97
2	68	73,4	97,2	97,5
3	73	80,1	98	97,4
4	69,6	75,6	97,4	97,6

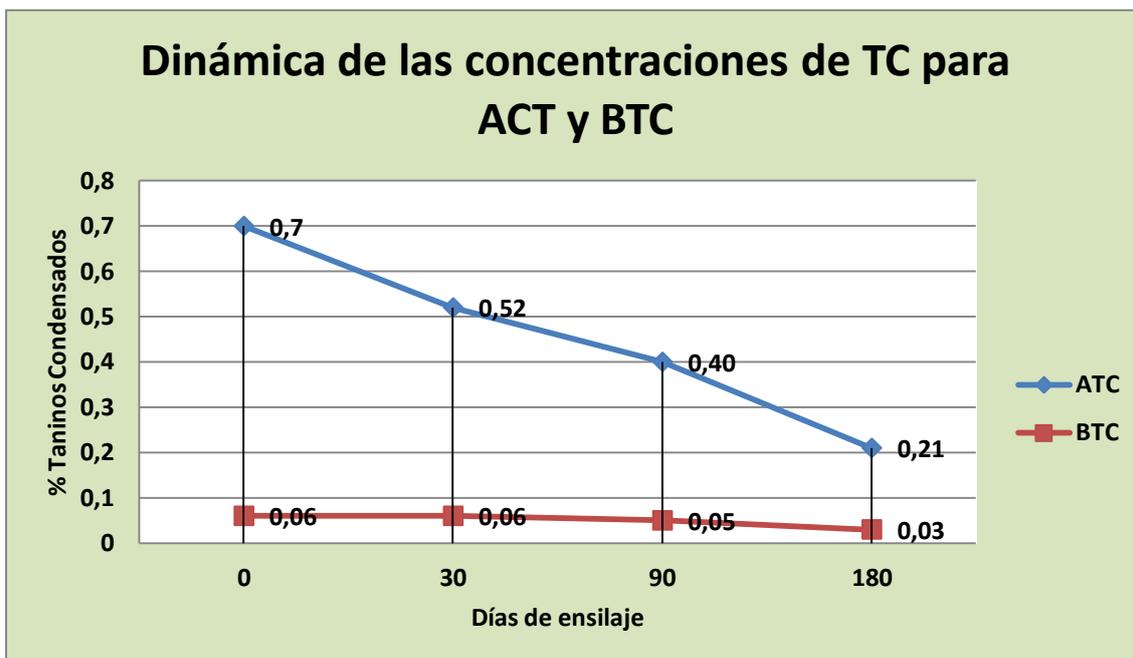
### Concentración de taninos condensados

Las concentraciones de TC fueron expresados como % de la MS. Partiendo de las concentraciones iniciales de TC obtenidas al día 0 logramos determinar que los productores 1 y 4 contenían un mayor nivel de TC con respecto a los productores 2 y 3.

Para la mejor interpretación de las variables analizadas, se agruparon en dos, de acuerdo a la concentración inicial de taninos TC; grupo alto (ATC) productores 1 y 4 y grupo bajo (BTC) productores 2 y 3.

Al día 0 el grupo ATC presentó valores de concentración de 0,70 % TC y el grupo BTC de 0,06 % TC. Los valores promedio al día 30, para el grupo ATC estuvieron entre 0,52 % y los BTC entre 0,06 %. A los 90 días, los valores promedios de taninos del grupo ATC descendieron a 0,40 %, mientras que en el grupo BTC fueron de 0,05 % de TC.

A los 180 días el grupo ATC presentó concentraciones mayores de TC (0,21 % TC) respecto al grupo BTC (0,03 % TC) ( $P < 0,05$ ). A lo largo del tiempo de almacenamiento (180 días) la concentración de TC en el grupo ATC descendió significativamente, a diferencia del grupo BTC en el cuál se mantuvo en valores similares al día 0 ( $P < 0,05$ ) (figura 14).



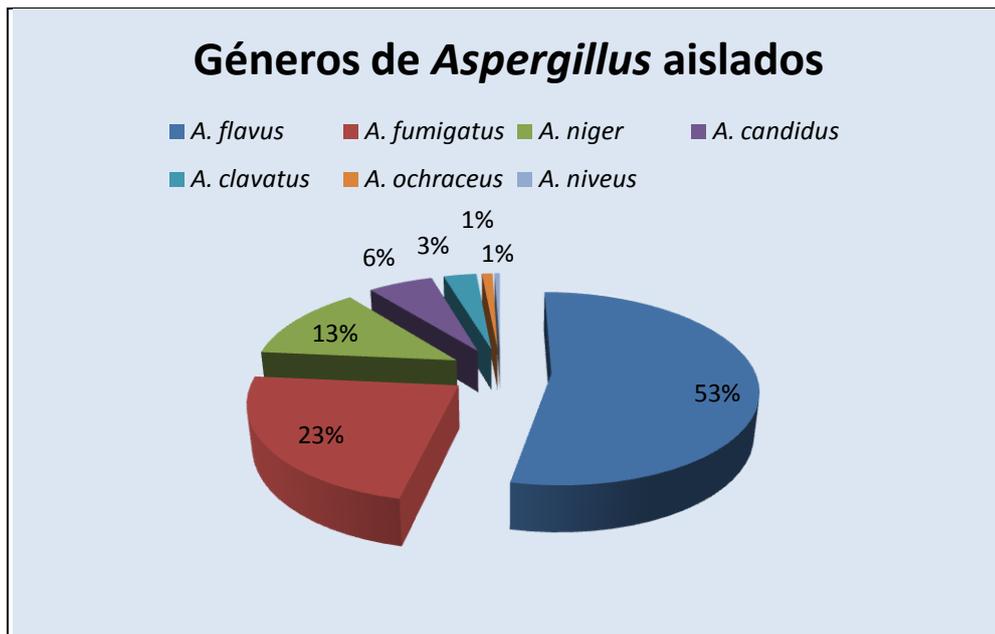
**Figura 14.** Dinámica de la concentración de taninos condensados en función del tiempo de ensilaje para los genotipos altos y bajos taninos

## Aislamiento e identificación de hongos toxicogénicos

El 100 % de las muestras de sorgo resultaron contaminados con hongos. Se obtuvieron 778 aislamientos pertenecientes a 32 géneros fúngicos. Los hongos toxicogénicos más frecuentemente aislados fueron *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*, en un 22,3 %, 20,4 % y 6,7 % del total de aislamientos respectivamente.

Otros géneros de hongos no toxicogénicos fueron aislados en alta frecuencia en las muestras de sorgo de campo y en las muestras del primer mes de almacenamiento.

*Penicillium* spp. fue aumentando su frecuencia a lo largo de cada apertura, siendo la mayor contaminación a los 180 días. Dentro del género *Aspergillus* se aislaron las siguientes especies: *A. flavus* (53,3 %), *A. fumigatus* (23,1 %), *A. niger* (12,8 %), *A. candidus* (6,1 %), *A. clavatus* (3,1 %), *A. ochraceus* (1 %) y *A. niveus* (0,5 %). Estos resultados se pueden observar en la Figura 15.



**Figura 15.** Gráfico de los géneros aislados de *Aspergillus*

*A. flavus* fue la especie que se encontró en mayor frecuencia observándose la mayor incidencia a los 30 días de almacenamiento (29,7 %). A partir de los 90 días los niveles de *A. flavus* disminuyen significativamente. Sin embargo, no se encontró correlación entre el porcentaje de infección de *A. flavus* y el tiempo de almacenamiento ( $P > 0,05$ ).

Las especies de *Fusarium* identificadas fueron *F. nygamai* (44,2 %), *F. graminearum* (36,5 %), *F. tricinctum* (3,8 %), *F. oxysporum* (0,9 %) y *F. semitectum* (0,9 %). Si bien *Fusarium* se encontró en baja incidencia, el mayor nivel se observó en las muestras antes de almacenar.

En el cuadro 3, se presentan las cantidades de hongos totales y de los géneros más frecuentes de las muestras de cada productor. Se puede observar que los productores 1 y 3 presentan una mayor contaminación al inicio. En el productor 1 se debe a la presencia de *Aspergillus* principalmente. Por el contrario la gran contaminación en el productor 3 no es por ninguno de los géneros toxicogénicos estudiados, sino por otras cepas fúngicas no toxicogénicas. El género *Fusarium* es el que se presenta en menor proporción en la mayor parte de las muestras, a excepción del productor 3 al inicio.

**Cuadro III.** Contaminación de hongos totales y por género para cada productor

Productor	Días de ensilaje	Hongos totales (UFC)	<i>Aspergillus</i> (UFC)	<i>Fusarium</i> (UFC)	<i>Penicillium</i> (UFC)
1	0	88	56	6	23
	30	54	48	0	4
	90	48	4	0	12
	180	39	0	0	15
2	0	7	1	0	3
	30	29	3	0	22
	90	22	2	1	15
	180	28	0	0	12
3	0	168	1	25	4
	30	47	31	6	6
	90	58	0	0	15
	180	97	0	10	45
4	0	17	15	0	2
	30	13	4	0	4
	90	19	0	0	0
	180	44	9	3	14

## DISCUSIÓN

Las determinaciones obtenidas de TC para las muestras de los productores ATC y BTC concuerdan con la información brindada comercialmente a los productores y analizadas en el Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Semillas (INASE) y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo comprobar que el tiempo de almacenaje de ensilajes de granos húmedos de sorgo conservados en silo-bags bajó la concentración de TC en los sorgos altos en taninos. Estadísticamente se observó un descenso significativo de las concentraciones de TC de los sorgos del grupo ATC en relación al tiempo de almacenaje para el grupo BTC, el cual se comportó de forma más estable. Si bien las concentraciones de TC para el grupo BTC no tuvieron cambios estadísticamente significativos a lo largo del período de almacenamiento, los valores absolutos de TC disminuyeron a la mitad a los 180 días respecto al día 0. Esto puede estar indicando que el nivel tan bajo de TC de las muestras utilizadas, no permitió detectar diferencias estadísticas.

Algunos autores, evidenciaron una reducción en la concentración de taninos en granos húmedos de sorgo almacenados, al ser tratados con urea al 2% o con PEG, llegando a obtener reducciones de 70 a 86 % (Russell y Lolley, 1989; Montiel y col., 2012). Esta reducción se explicaría porque la urea en presencia de humedad genera amonio, lo cual incrementa notablemente el pH y en estas condiciones de alcalinidad los taninos serían mucho menos reactivos (Makkar y Becker, 1996). En los silo-bags estudiados los pH estuvieron en un rango inicial de 4,89 – 6,53 y a los 180 días entre 4,43 – 4,62, por lo cual los TC no sufrieron alteraciones debido a este parámetro (ver Anexos).

Además, en este trabajo no se utilizaron agregados de urea ni de PEG, como método de reducción de la concentración de taninos. Por lo tanto, la disminución de los niveles de TC, podrían ser explicados tanto por el efecto del tiempo de almacenamiento y los procesos que suceden durante el ensilaje, como por las pérdidas sufridas en el a través de los efluentes producidos durante el mismo. Estos compuestos fenólicos son solubles en agua, pudiendo ser arrastrados en los efluentes (Arranz Martínez, 2010).

Además de las pérdidas por efluentes, el quebrado previo de los granos, que se realiza comúnmente en la confección de los silo-bags, podría explicar parte de la disminución del contenido de TC, como ha sido estudiado por Chibber y col., (1978). El quebrado del grano, permite la remoción del pericarpio y de la testa, siendo esta última estructura el sitio donde se ubican los TC quedando estos más expuestos al medio (Domanski y col., 1997).

Durante el almacenamiento, se observó que a los 30 días se presentaron los mayores descensos en las concentraciones de TC, principalmente en el grupo ATC, y si bien estos cambios continuaron, luego de este período no fueron tan pronunciados. Esto podría deberse a que a partir de los 30 a 40 días, los silos se encuentran en la fase de estabilización, cuando el pH logra garantizar la conservación del material. Esto se mantiene hasta el momento de la apertura del silo, donde comienza la fase de deterioro aeróbico (Scarpitta, 2008). Dos de los productores abrieron los silo-bags durante el muestreo realizado, no observándose particularidades con respecto a los otros dos silos que permanecieron cerrados. A pesar del significativo descenso de las concentraciones de TC en el grupo ATC, las mismas siempre se mantuvieron por encima de las observadas para el grupo BTC.

Con respecto a la determinación y aislamiento de los principales hongos toxicogénicos en las muestras de sorgo, cabe destacar que todos los ensilajes de grano húmedo de sorgo presentaron en algún momento aislamiento de hongos toxicogénicos. Como era de esperarse los niveles de contaminación del género *Fusarium* fueron elevados al momento del ensilaje, bajando luego a niveles prácticamente nulos, esto concuerda con lo reportado por otros autores (D'Mello y col., 1999).

Para analizar los resultados en cuanto a la contaminación fúngica, se observaron los cuatro genotipos de sorgo de forma individual, sin agruparlos en ATC y BTC, ya que no hubo diferencias significativas entre los TC y las poblaciones de hongos. Esto podría deberse a que solamente se compararon cuatro variedades de sorgo. Un número de muestras mayor podría arrojar información estadísticamente relevante.

A continuación, se describen particularidades de cada situación en los establecimientos, para explicar las diferencias encontradas en los hongos observados, teniendo en cuenta la fecha de siembra y el tiempo de cosecha, así como las características de cada genotipo en estudio. La evolución de las poblaciones fúngicas totales y por género toxicogénico en relación al tiempo, para cada productor, se pueden observar en las figuras que aparecen en anexos.

El productor 1, que utilizó la variedad Aca 558, al día cero presentó una alta contaminación fúngica total, que se explicaría principalmente por una alta carga de *Aspergillus*, hongo contaminante de almacenamiento (D'Mello y col., 1999). En este caso esta alta incidencia podría atribuirse a que la muestra entre la colecta y su conservación en el laboratorio se demoró seis días. En tanto las poblaciones de *Penicillium* y *Fusarium* no fueron tan importantes.

A los 30 días, en este productor, predominaron las cepas de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, y las cepas de *Penicillium* y *Fusarium* se hicieron casi nulas. Sin embargo a los 90 y 180 días, este productor presentó un aumento en la contaminación de cepas de *Penicillium*. Este silo, fue abierto previo a los 90 días y el deterioro aeróbico podría ser el responsable de la contaminación encontrada.

El productor 2, con la variedad Flash 10, comenzó al día cero con muy poca contaminación fúngica total, sin destacarse ninguna de las cepas toxicogénicas en estudio, en cambio al día 30 del almacenamiento, éste presentó un aumento en la contaminación de *Penicillium* y a los 90 y 180 días las cargas de los tres géneros, disminuyeron. La mayor incidencia de hongos totales al final del periodo de estudio, se debió a la presencia de otras cepas fúngicas (cepas celulolíticas) no estudiadas. Particularmente este silo de sorgo, se abrió durante el período estipulado del experimento y se inundó.

El productor 3, con la variedad de sorgo 546, al día cero, presentó alta carga total de hongos, específicamente de cepas de *Fusarium*, hongo clasificado como contaminante de campo (FAO, 2010). Esto se explicaría porque la cosecha se demoró un mes con respecto a la fecha estipulada para esta variedad, provocando una gran contaminación en el campo y reflejándose en el conteo posterior del mismo.

A los 30 días, este productor presentó un aumento en las poblaciones de *Aspergillus*, como puede esperarse en este tipo de ensilaje (FAO, 2010). *Fusarium* disminuyó, en tanto *Penicillium* presentó un leve aumento. A los 90 y 180 días se observó un aumento en el total de hongos, en particular a los 180 días de almacenamiento, las poblaciones de *Penicillium* y *Fusarium* aumentaron notoriamente. Este silo-bags permaneció cerrado durante el estudio.

Por último, el productor 4, que utilizó una variedad Morgan 108, al día cero comenzó con una muy baja contaminación total de hongos donde solo se destaca una mínima presencia de *Aspergillus*. Luego a los 30 días no hubo cambios importantes, solo se observa una disminución del género *Aspergillus*. A los 90 y 180 días se observó un aumento fúngico total, comprendido por cepas de *Penicillium*, *Aspergillus* y algo de *Fusarium*. Este silo también permaneció cerrado mientras se realizaron los muestreos.

Entre las especies toxicogénicas identificadas, predominaron *A. flavus*, productor de aflatoxinas y *F. nygamai*, productor de fumonisinas. Estas micotoxinas son de gran toxicidad en humanos y animales (Yiannikouris y Jouany, 2002). Las determinaciones de aflatoxinas y fumonisinas, realizadas por la Técnica de Elisa en el Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria, siempre estuvieron por debajo de los límites permitidos según las normas del Mercosur. No se reportaron problemas sanitarios ni productivos en las vacas que consumieron los silos involucrados en el estudio, durante y posterior al muestreo (Carmen García y Santos, comunicación personal, (2012).

## **CONCLUSIONES**

Los resultados de este trabajo permitieron establecer que existió un efecto del tiempo de almacenamiento en los silo-bags sobre la concentración de TC en los genotipos de sorgo ATC estudiados.

Los niveles de TC en los genotipos ATC disminuyeron en función del tiempo de almacenamiento mientras que en los BTC permanecieron estables.

Los cuatro silo-bags estudiados presentaron perfiles diferentes de hongos toxicogénicos independientemente de los niveles de TC.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abdel Moneim E, Sulieman, Fatima M, Issa, Elamin A, Elkhalifa. (2007). Quantitative Determination of Tannin Content in some Sorghum cultivars and Evaluation of its Antimicrobial Activity. Disponible en: <http://scialert.net/gredirect.php?doi=jm.2007.284.288&linkid=pdf> Fecha de consulta: 20/6//2012.
- 2) Araújo VL, Rodríguez NM, Gonçalves LC, Rodríguez JA, Borges I, Borges ALCC, Saliba EOS. (2002). Qualidade das silagens de três híbridos de sorgo ensilados em cinco diferentes estádios de maturação Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352007000100028&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352007000100028&script=sci_arttext) Fecha de consulta: 18/5/2012.
- 3) Arranz Martínez S. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/11255/1/T32158.pdf> Fecha de consulta: 20/5/12.
- 4) Auebach H. (1996). Moul growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions. 247-259.
- 5) Bennet WF, Tucker B. (1986). Producción moderna de sorgo granífero. Buenos Aires ed. Hemisferio Sur. Disponible en: <http://www.libreriaolejnik.com/ventana.php?codig=10111> Fecha de consulta: 5/5/2012.
- 6) Carámbula M. (2007). Verdeos de verano. Montevideo, Hemisferio Sur 226p.
- 7) Chalkling DJ, Brasesco R. (1997). Silo de grano húmedo una alternativa promisorio. Revista del Plan Agropecuario. 25(76):22-26.
- 8) Chelkowski J. (1991). Preface. En: Chelkowski J. Mycotoxins. Cereal grain, fungi and quality in drying and storage. (ed). Amsterdam: Elsevier, p: 77-118.
- 9) Chessa A. (2001). Calidad del sorgo granífero. Revista Agro Mercado. 62:7-9. Disponible en: [http://www.agromercado.com.ar/pdfs/062\\_sorgo\\_01.pdf](http://www.agromercado.com.ar/pdfs/062_sorgo_01.pdf) Fecha de consulta: 20/5/2012.
- 10) Chibber. (1978). Effects of Tannin Content, Protein Distribution, and Quality of High and Low Tannin Sorghum. Journal of Agricultural and Food Chemistry 26(3):679-683.

- 11) Chiossone J, Misi O, Vicini R. (2011). Silaje de sorgo. INTA. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/silaje-de-sorgo/> Fecha de consulta: 28/5/2012.
- 12) Colvin BM, Harrison LR, Gosser HS, Hall RF. (1984). Aflatoxicosis in feeder cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association 184: 956-958.
- 13) Coria ML. (2007). Calidad de sorgo según tipo y momentos de corte. Sitio argentino de producción animal. Estación experimental agropecuaria Bordenave. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/maiz\\_sorgo/154-calidad\\_sorgo\\_segun\\_tipo\\_y\\_corte.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/maiz_sorgo/154-calidad_sorgo_segun_tipo_y_corte.pdf) Fecha de consulta: 20/5/2012.
- 14) Coulombe RA Jr. (1993). Symposium: Biological Action of Mycotoxins. Journal of Dairy Science 76: 880-891.
- 15) Díaz MG, López R, Blanzaco E, Valentinus O, Ishigaki A, Picotti R. (2007). Manejo del cultivo de sorgo granífero. Agro Mercado. 142:9-14.
- 16) DIEA. (2010). Anuario estadístico agropecuario 2010. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,583,O,S,0,MNU;E;27;7;MNU;> Fecha de consulta: 22/05/2012.
- 17) Diekman MA, Green ML. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. Journal of Animal Science. 70: 1615-1627.
- 18) D'Mello JPF, Placinta CM, MacDonald AMC. (1999). Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. Animal Feed Science and Technology 80: 183-205.
- 19) Domanski C, Giorda LM, Feresin O. (1997). Composición y calidad del grano de sorgo. EEA, INTA, Manfredi, Argentina, Cuaderno de Actualización N° 7, 47-50. Disponible en: [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/suplementacion/42-calidad\\_y\\_composicion\\_del\\_grano\\_de\\_sorgo.htm](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion/42-calidad_y_composicion_del_grano_de_sorgo.htm) Fecha de consulta: 4/5/2012.
- 20) FAO. (1995). El sorgo y el mijo en la nutrición humana. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t0818s/T0818S00.htm#Contents> Fecha de consulta: 5/5/2012.
- 21) FAO. (1999). Tercera Conferencia Internacional FAO/OMS/PMA sobre micotoxinas. Túnez, 3-6 de marzo. Disponible en: <http://www.quiveter.com/ftp/articles/articulo268.pdf> Fecha de consulta: 10/5/2012.

- 22)FAO – IAEA. (2000). Quantification of Tannins in Tree Foliage. Disponible en: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/pubd31022manual-tannin.pdf> Fecha de consulta: 5/5/2012.
- 23)Fontes LAN, Moura Filho. (1979). W. Calagem e adubação., Belo Horizonte, Informacion Agropecuaria. 5(56):17-19.
- 24)Gallo GG, (1987).Plantas toxicas para el ganado en el cono Sur de América. 2º ed, Buenos Aires, Hemisferio Sur, 213 p.
- 25)Hagerman A, Robbins CHT, Weerasuriya Y, Wilson TC, McArthur C. (1992). Tannin chemistry in relation to digestion. Journal of Range Management 45 (1):57-62.
- 26)Hammes WP, Weiss N, Holzapfel W. (1992). The Genera Lactobacillus and Carnobacterium. En: The prokaryotes pp. 320-403. Disponible en: [http://rd.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30744-3\\_10](http://rd.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30744-3_10) Fecha de consulta: 26/7/2012.
- 27)Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JR. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1 a toxic metabolite of Fusarium moniliforme. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2:217.
- 28)Hibberd CA, Wagner DG, Hintz RL. (1985). Effect of sorghum grain variety and reconstitution on site and extent of starch and protein digestion in steers. Journal of Animal Science, 61(3):702-712.
- 29)Huyghe C, Bayourthe C. (2010) .The effects of condensed tannis in sainfoin *Onobrychis viciifolia*. Disponible en: <http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/66/95/57/PDF/2010CLF22096 - K - THEODORIDOU.pdf> Fecha de consulta: 29/4/2012.
- 30)Jansman AJM. (1993). Tannins in feedstufs for simple stomached animals. Nutrition Research Reviews, 6:209-236.
- 31)Jones WT, Mangan JL. (1977). Complexes of condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop.) with fraction-1 leaf protein and with sub maxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. Journal of the Science of Food and Agriculture, 28: 126-136.
- 32)Josifovich J, Maddalonl J, Echeverria I. (1987).Sorgo con tanino y maíz en la producción de carne bovina. Revista Argentina de Producción Animal, 7(3):237-243.

- 33)Kumar A, Vaithyanathan S. (1990). Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30: 21-38.
- 34)Kumar R, Singh M. (1984). Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(3):447-453.
- 35)Magalhaes PC, Alvarenga W, Rodrigues FO, Duraes M. (1997). Tanino no grau de sorgo bases fisiológicas e métodos de determinação. *Circular técnica Embrapa Milho e Sorgo, Circular Técnica Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo*. 27:26 p.
- 36)Makkar HPS, Becker K. (1996). Effect of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1291-1295.
- 37)Makkar HPS, Singh B. (1993). Effect of storage and urea addition on detannification of nature oak (*Quercus incana*) leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 41: 247-259.
- 38)Mangan JL, (1988). Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Revista, Nutrition Research Reviews* 1: 209-231.
- 39)Marasas WFO, Jaskiewicz K, Venter FS, Van Schalkwyk DJ. (1988). *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *South African Medical Journal*, 74:110-114.
- 40)McDonald P, Henderson AR, Heron SJE. (1991). *The Biochemistry of Silage*. 2a. ed. Marlow. Chalcombe Publications. 33p.
- 41)McDonald P, Edwards R, Greenhalgh J, Morgan C. (2006). *Nutrición Animal*. 6° ed. Acribia, Zaragoza. 587 p.
- 42)Miereles MCA, Riet-Correa F. (1993). Introdução ao estudo das micotoxicoses. En: Riet-Correa F, Méndez MC, Shild AL. *Intoxicaciones por plantas e micotoxicoses em animais domesticos*. Pelotas. Hemisferio. p21-41.
- 43)Montiel MD, Elizalde JC, Santini F, Giorda L. (2012). Desactivación de taninos en grano húmedo de sorgo con polietilenglicol o urea. *Archivos de zootecnia* 61(234):237. Disponible en: [http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/az.php?idioma\\_global=1&revista=170&codigo=2120](http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/az.php?idioma_global=1&revista=170&codigo=2120) Fecha de consulta: 5 /9/2012.
- 44)Osweiler GD, (2000). Mycotoxins: Contemporary Issues of Food Animal Health and Productivity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 16(3): 511-530.

- 45) Otero, Hidalgo. (2003). Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parásitos gastrointestinales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Tandil. UNICEN, Buenos Aires. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd16/2/oter1602.htm> Fecha de consulta: 6/5/2012.
- 46) Oude Elferink SJWH, Driehuis .F, Gottschal JC, Sierk F, Spoelstra SF. (2001). Estudio 2.0 17. FAO. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos, Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/X8486s/x8486S04.htm> Fecha de consulta: 6/5/2012.
- 47) Perez-maldonado, R.A.; Norton, B.W. (1996). Digestion of 14C-labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *British Journal of Nutrition*, 76:501-513.
- 48) Phillip LE, Fellner V. (1992). Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers. *Journal of Animal Science*, 70: 3178-3187.
- 49) Poppi DP, Mc Rae JC, Brewer A, Coop RL (1986). Nitrogen Transactions in the digestive tract of lambs exposed to the internal parasite, *Trichostrongylus Colunbriformis*. *British Journal of Nutrition* 55: 593-602.
- 50) Porter LJ, Liana N, Hrstich, Bock G, Chan. (1985). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding sns delphinidin. *Phytochemistry*. 25(1): 223-230.
- 51) Reed JD, (1995). Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal of Animal Science*. 73:1516-1528.
- 52) Ribeiro Pereira, Rodriguez NM, Gonçalves LC, Ananias de Assis Pirescol D. (2007). Disponible en: [http://www.cpatsa.embrapa.br/public\\_eletronica/downloads/OPB1703.pdf](http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB1703.pdf) Fecha de consulta: 6/5/2012.
- 53) Russell RW, Lolley JR. (1989). Deactivation of tannin in high tannin milo by treatment with urea. *Journal of Dairy Science*, 72:2427-2730. Disponible en: <http://www.journalofdairyscience.org/search/quick> Fecha de consulta 10/9/2012.
- 54) Scarpitta N. (2008). ¿Qué necesitamos conocer sobre el silo de grano húmedo de sorgo? *Revista del Plan Agropecuarios*, (126):48-54. Disponible en: [http://www.planagro.com.uy/publicaciones/revista/R126/R\\_126\\_48.pdf](http://www.planagro.com.uy/publicaciones/revista/R126/R_126_48.pdf) Fecha de consulta: 25/4/2012.

- 55) Silanikove N, Perevolotsky A, Provenza FD. (2001). Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 69-81
- 56) Van Soest. (1994). P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press p476. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=-mwUu6PL1UgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.es/books?id=-mwUu6PL1UgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false) Fecha de consulta: 4/5/2012.
- 57) Vaz Martins D, Seigal E, Pittaluga O. (2001). Producción de carne con sudangras dulce, híbrido de sudangras x sorgo granífero y sorgo doble propósito. Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (17), La Habana, Cuba. Trabajos: Nutrición. La Habana ALPA 1 CD ROM.
- 58) Weaver GA, Kurtz HJ, Beherens JC, Robison TS, Seguin B.N, Bates FY, Mirocha CJ. (1986). Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research*, 47 (6): 1395-1397.
- 59) Weaver GA, Kurtz HJ, Beherens JC, Robison TS, Seguin BN, Bates FY, Mirocha CJ, (1986). Effect of zearalenone on dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, 47 (8): 1826-1828.
- 60) Woolford MK, Pahlow G. (1984). The silage fermentation. En: Wood, BJB, *Microbiology of Fermented Foods*. 2a. ed. London, T.J International, Padstow, p73-102.
- 61) Yiannikouris A, Jouany JP. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51:81-99.
- 62) Zimmer Y, Cordesse. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants; *INRA Producción Animal*, 9 (3): 167-179.
- 63) Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45(1):1

## ANEXOS

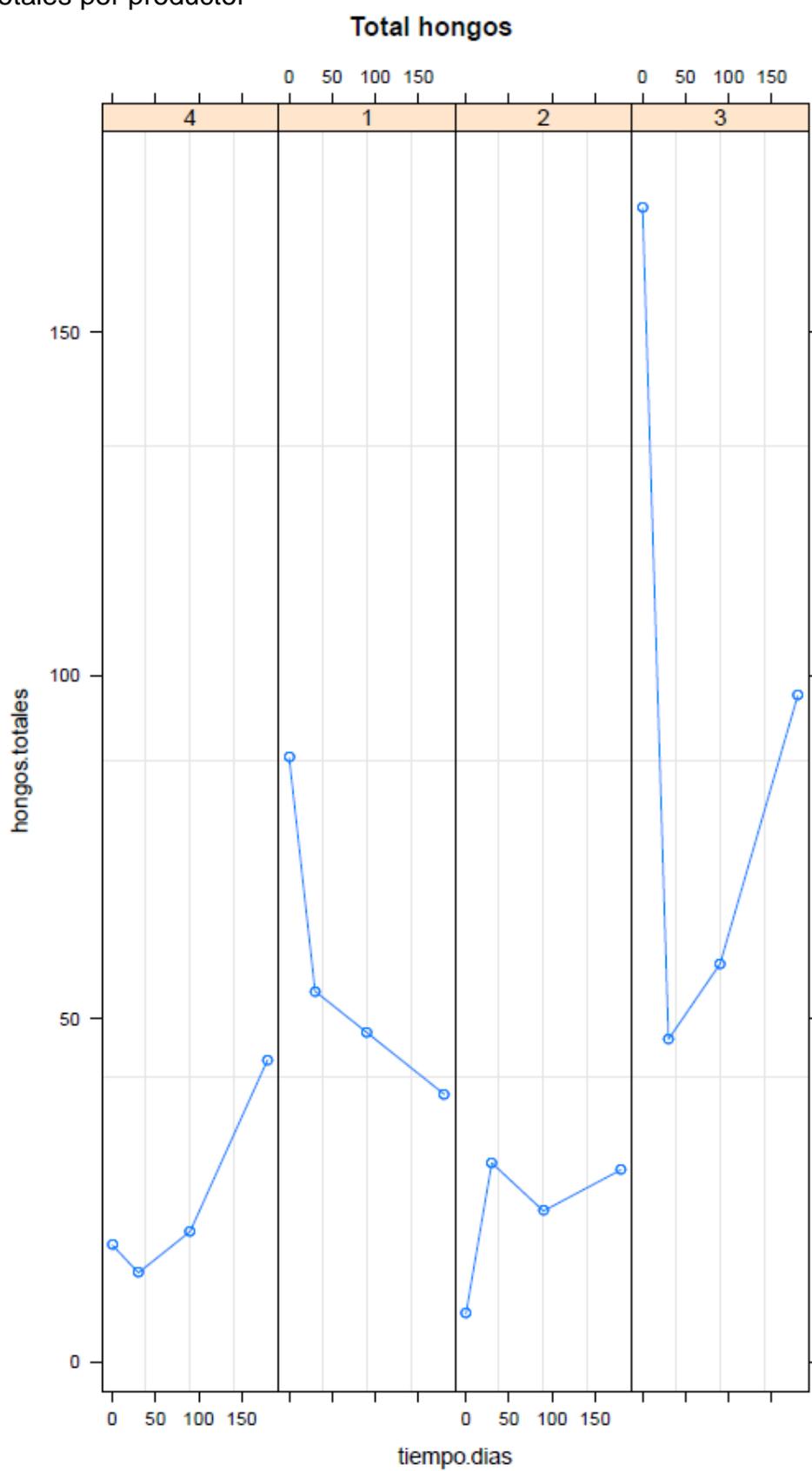
Porcentaje de taninos condensados en Materia seca para cada productor

Productor	Días de ensilaje			
	0	30	90	180
1	0,54	0,41	0,44	0,29
2	0,06	0,04	0,06	0,04
3	0,05	0,07	0,03	0,02
4	0,86	0,62	0,36	0,13

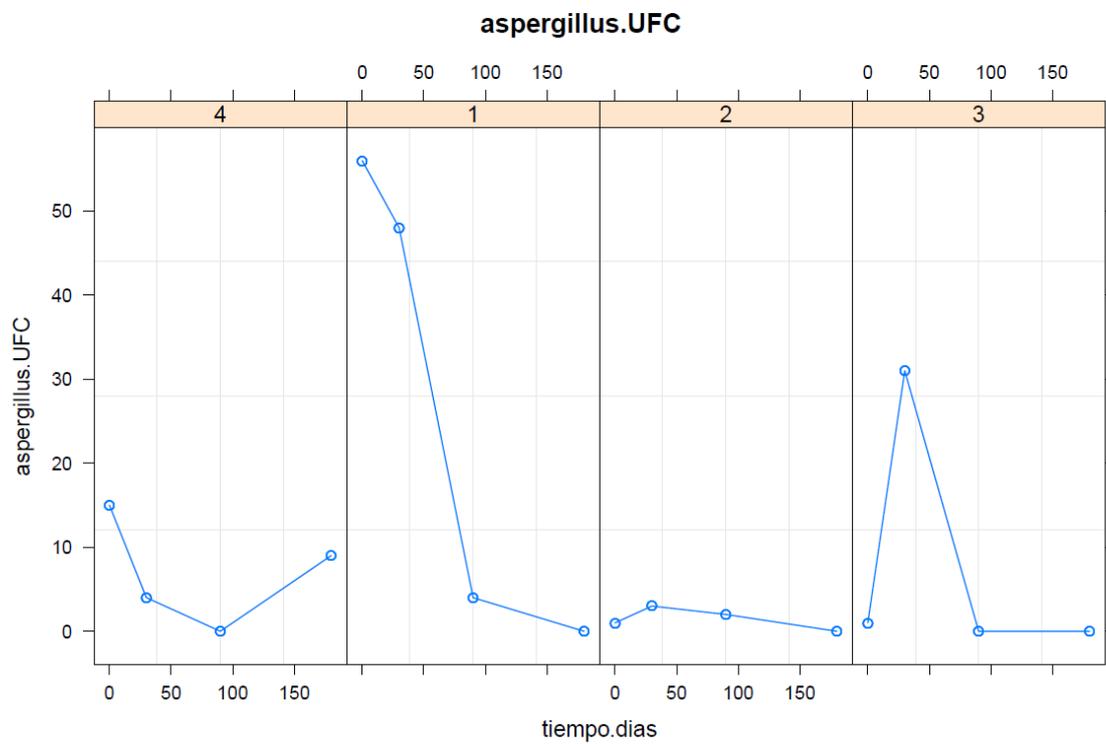
Resultados de la lectura del pH en los distintos días de apertura de los distintos microsilos de sorgo de todos los Productores.

Productores	Día 0	Día 30	Día 90	Día 180
	pH campo	pH campo	pH campo	pH campo
1	5,95	4,71	4,37	4,55
2	5,45	4,61	4,25	4,43
3	6,53	5,05	4,23	4,62
4	4,89	4,16	4,58	4,5

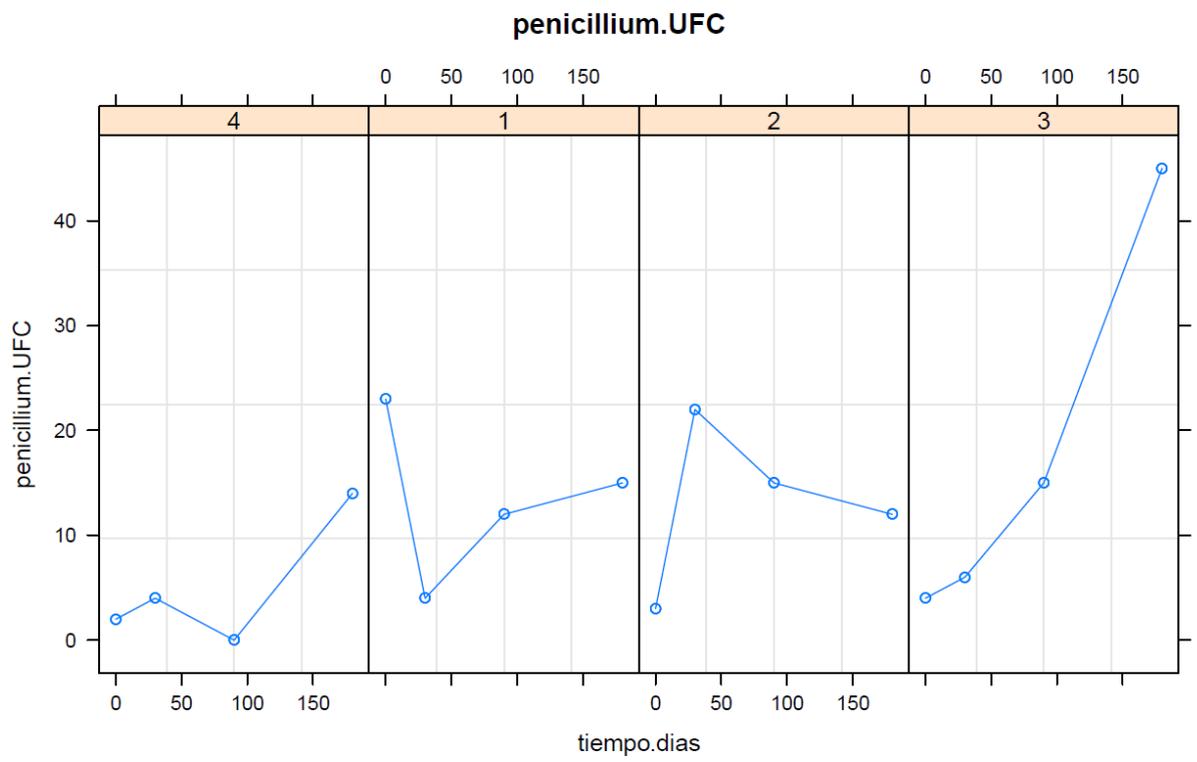
# Hongos totales por productor



# Aspergillus (UFC), por cada productor



# Penicillium (UFC) por cada productor



# Fusarium (UFC) por cada productor

