

**INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS CON POLIETILENGLICOL O UREA,
TEXTURA DEL ENDOSPERMA Y ESTADO FENOLÓGICO SOBRE EL
GRANO DE SORGO.**

María Delfina Montiel

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de
DOCTOR en CIENCIAS AGRARIAS

Área de Producción Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
AGRARIAS

**FACULTA DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Balcarce, Argentina

Agosto, 2013

**INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS CON POLIETILENGLICOL O UREA,
TEXTURA DEL ENDOSPERMA Y ESTADO FENOLÓGICO SOBRE EL
GRANO DE SORGO**

María Delfina Montiel

.....
Juan Carlos Elizalde
(Ing. Agr., M. Sci., Ph. D.)
Director de Tesis

.....
Francisco José Santini
(Ing. Agr., M. Sci., Ph. D.)
Co-Director de Tesis

.....
Laura M. Giorda
(Ing. Agr., Ph. D.)
Miembro del Comité Asesor

**INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS CON POLIETILENGLICOL O UREA,
TEXTURA DEL ENDOSPERMA Y ESTADO FENOLÓGICO SOBRE EL
GRANO DE SORGO**

María Delfina Montiel

Aprobada por:

.....
Hugo Mario Arelovich
(Ing. Agr., M. Sc., Ph.D)
Evaluador

.....
María Cecilia Cajarville Sanz
(Dr. Med. y Tec. Vet., Ph. D)
Evaluadora

.....
Juan José Grigera Naón
(Ing. Agr., M. Sc., Ph. D)
Evaluador

DEDICATORIA

A **Gustavo y Bautista**, por “sufrirla” conmigo y levantarme todas las veces que caí,
fueron mi pilar fundamental de todos estos años.
Sin ustedes este “imposible” no lo hubiese cumplido.

INFINITAMENTE GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

A través de este medio quiero expresar mi sincero agradecimiento:

- A mamá, papá, Juliana y Elina porque a pesar de estar lejos siempre estuvieron conmigo
- A Juan y Francisco por permitirme cumplir mi objetivo
- A mi amiga Adriana Cano por sacarme las “papas del fuego” siempre que la necesité
- A mis viejos amigos, los de siempre
- A mis nuevos amigos que me acompañaron en este camino
- A Miguel Brizuela, quien desinteresadamente me ayudó a encaminar el final
- A Adrián Cardona, y todo el personal de Reserva 7 de la EEA INTA Balcarce
- Victor Burgui y Carlos Robson “pie de obra” calificado
- A las cuatro “avutardas” que se unieron en la última etapa de mi largo camino
- A la Fundación YPF, que a través de una Beca “José A. Estensoro”, financió parte de este trabajo

A todos, de corazón, **muchas gracias**.....

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Constitución y composición de los granos de sorgo.....	6
2.2. Factores que afectan el valor nutritivo del grano de sorgo.....	8
2.2.1. Tipo y textura del endosperma.....	8
2.2.2. Método de procesamiento.....	9
2.2.3. Taninos.....	11
2.3. Taninos condensados en el grano de sorgo.....	12
2.4. Efecto de los taninos del grano de sorgo sobre la digestión y respuesta animal.....	16
2.5. Métodos para remover o inactivar taninos.....	18
2.5.1. Almacenamiento del grano con alto contenido de humedad y bajo condiciones de anaerobiosis.....	18
2.5.2. Tratamiento con urea.....	19
2.5.3. Tratamiento con polietilenglicol.....	22
2.6. HIPOTESIS.....	25
2.7. OBJETIVOS.....	26
3. Capítulo 1: IMPACTO DE LA HUMEDAD DE COSECHA Y EL PROCESO DE ENSILADO SOBRE EL CONTENIDO DE TANINOS Y LA DESAPARICIÓN <i>IN SITU</i> DEL GRANO DE SORGO. Experimentos 1 y 2.....	27
3.1. Introducción.....	27
3.2. Materiales y métodos.....	28
3.2.1. Materiales experimentales e implantación del cultivo.....	28
3.2.2. Confección de los microsilajes.....	29
3.2.3. Análisis de calidad de los silajes.....	30
3.2.4. Determinación de la desaparición <i>in situ</i>	30
3.2.5. Tratamientos y análisis estadísticos.....	32
3.3. Resultados y discusión.....	35
3.3.1. Experimento 1.....	35
3.3.2. Experimento 2.....	44
3.4. Conclusiones.....	47

4. Capítulo 2: DESAPARICIÓN RUMINAL DE UN GRANO DE SORGO ALTO EN TANINOS TRATADO CON POLIETILENGLICOL 4000 O UREA. EFECTOS DE LAS DOSIS, CONTENIDO DE HUMEDAD Y ANAEROBIOSIS. Experimentos 3, 4 y 5.....	49
4.1. Introducción.....	49
4.2. Materiales y métodos.....	50
4.3. Resultados y discusión.....	56
4.3.1. Experimento 3.....	56
4.3.2. Experimento 4.....	61
4.3.3. Experimento 5.....	70
4.4. Conclusiones.....	75
5. Capítulo 3: DIGESTIBILIDAD TOTAL APARENTE Y METABOLISMO RUMINAL EN BOVINOS ALIMENTADOS CON DIETAS A BASE DE GRANO HÚMEDO DE SORGO ALTO EN TANINOS TRATADO CON POLIETILENGLICOL 4000 O UREA. Experimento 6.....	76
5.1. Introducción.....	76
5.2. Materiales y métodos.....	77
5.3. Resultados y discusión.....	81
5.4. Conclusiones.....	86
6. Capítulo 4: EFECTO DEL PROCESO DE ENSILADO SOBRE LOS TANINOS Y LA TEXTURA DEL ENDOSPERMA. PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> Y RESPUESTA PRODUCTIVA DE TERNERAS ALIMENTADAS A CORRAL. Experimentos 7 y 8.....	87
6.1. Introducción.....	87
6.2. Materiales y métodos.....	88
6.2.1. Materiales experimentales, implantación del cultivo y confección de los silajes.....	88
6.2.2. Análisis de calidad de los silajes.....	89
6.2.3. Ensayos de producción de gas <i>in Vitro</i> (experimento 7).....	90
6.2.3.1. Tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico.....	90
6.2.3.2. Determinación de la producción de gas <i>in vitro</i>	92
6.2.4. Ensayo de engorde a corral (Experimento 8).....	94
6.2.4.1. Sitio experimental, animales, tratamientos y diseño experimental.....	94
6.2.4.2. Mediciones y muestreos.....	95

6.2.4.3. Análisis estadístico de los datos.....	96
6.3. Resultados y discusión.....	97
6.3.1. Ensayos de producción de gas in Vitro (Experimento 7).....	97
6.3.2. Ensayo de engorde a corral (Experimento 8).....	106
6.4. Conclusiones.....	114
7. CONCLUSIONES GENERALES.....	115
8. BIBLIOGRAFÍA.....	118

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efectos de las humedades de cosecha sobre los parámetros químicos y fermentativos de los granos.....	36
Tabla 2: Concentración de taninos en genotipos alto (AT) y bajo (BT) en diferentes momentos de cosecha.....	37
Tabla 3: Parámetros químicos y fermentativos del grano alto tanino ensilado y no ensilado.....	44
Tabla 4: Efectos de las sustancias (PEG-4000 o urea), sobre los parámetros químicos y fermentativos de los de granos con alto contenido de taninos almacenados húmedos en condiciones de anaerobiosis (promedio de las dosis)	56
Tabla 5: Desaparición <i>in situ</i> de la MS, PB y ALM de los granos de sorgos húmedos tratados con diferentes dosis de PEG-4000 o urea y almacenados en anaerobiosis	59
Tabla 6: Efectos de las sustancias (PEG-4000 o urea) sobre los parámetros químicos fermentativos de los granos de sorgos con alto contenido de taninos almacenados húmedos en condiciones de anaerobiosis (promedio de las humedades de cosechas y dosis).....	62
Tabla 7: Efectos de las diferentes dosis de urea y la humedad de cosecha sobre el pH y la concentración de N-NH ₃ /NT en granos de sorgo.....	64
Tabla 8: Desaparición <i>in situ</i> de la MS, PB y ALM de los granos de sorgos cosechados con 25% de humedad, tratados con diferentes dosis de PEG-4000 o urea y almacenados en anaerobiosis	66
Tabla 9: Desaparición <i>in situ</i> de la MS, PB y ALM de los granos de sorgos cosechados con 35% de humedad, tratados con diferentes dosis de PEG-4000 o urea y almacenados en anaerobiosis.....	67
Tabla 10: Efecto de las humedades de cosecha y el tratamiento con PEG-4000 sobre la DIVMS (%) del grano de sorgo.....	71
Tabla 11: Efectos del tipo de almacenamiento y el tratamiento con PEG-4000 sobre los niveles de taninos (mg eq. Ácido tánico/100g de muestra seca) del grano de sorgo.....	72
Tabla 12: Desaparición <i>in situ</i> de la MS, PB y ALM de granos cosechados con diferentes contenidos de humedad y tratados con PEG-4000	74
Tabla 13: Parámetros químicos y de calidad de los diferentes componentes de	

las dietas.....	78
Tabla 14: Consumos promedios de cada una de las fracciones evaluadas en los diferentes tratamientos.....	82
Tabla 15: Efecto de la adición de PEG-4000 o urea sobre la digestibilidad total aparente de la dieta y sobre los parámetros ruminales y plasmáticos.....	85
Tabla 16: Producción de gas potencial y tiempo de retardo de los diferentes híbridos y tipos de almacenamientos.....	97
Tabla 17: Tiempo a la mitad de la producción de gas y la tasa en ese punto de los endospermas de diferentes híbridos y almacenamientos.....	99
Tabla 18: Efecto del proceso de ensilado sobre la concentración de los taninos de diferentes híbridos de sorgo.....	100
Tabla 19: Efecto del agregado de diferentes proporciones de taninos sobre los parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> de los granos alto taninos con diferentes texturas de endosperma	102
Tabla 20: Parámetros químicos y fermentativos de los diferentes silajes de granos húmedos de sorgos utilizados en el ensayo de producción.....	107
Tabla 21: Composición química y contenido de nutrientes de las diferentes dietas.....	108
Tabla 22: Respuestas productivas de terneras alimentadas con dietas constituidas con diferentes silajes de granos de sorgo.....	111

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Diagrama de un cariopse de sorgo.....	7
FIGURA 2: Estructura molecular de un flavonoides (a) y de los taninos condensados (b).....	14
FIGURA 3: Polímeros que se unen a taninos.....	23
FIGURA 4: Desaparición <i>in situ</i> de silajes de granos de sorgos con alto (AT) y bajo (BT) contenido de taninos (promedio de las tres humedades de cosecha).....	40
FIGURA 5: Desaparición <i>in situ</i> de silajes de sorgo cosechados y ensilados con diferentes humedades (promedio de ambos híbridos, AT y BT).....	41
FIGURA 6: Desaparición <i>in situ</i> de silajes de granos de sorgos húmedos o secados artificialmente (seco).....	43
FIGURA 7: Desaparición <i>in situ</i> de granos de un genotipo alto tanino ensilado y no ensilado.....	45
FIGURA 8: Efecto del agregado de PEG-4000 o urea sobre la desaparición ruminal del grano húmedo de sorgo.....	58
FIGURA 9: Efecto del agregado de PEG-4000 o urea sobre la desaparición ruminal del grano de sorgo (promedio de las humedades de cosechas).....	65
FIGURA 10: Efecto del tipo de almacenamiento de un grano de sorgo con alto contenido de taninos sobre la desaparición <i>in situ</i>	73
FIGURA 11: Tasas de producción de gas <i>in vitro</i> producto de la fermentación del grano húmedo de sorgo ATH con diferentes porcentajes de agregado de taninos (0, 50, 100, 150), valores promedios de taninos provenientes de granos ensilados y no ensilados.....	104
FIGURA 12: Tasas de producción de gas <i>in vitro</i> producto de la fermentación del grano húmedo de sorgo ATV con diferentes porcentajes de agregado de taninos (0, 50, 100, 150), valores promedios de taninos provenientes de granos ensilados y no ensilados.....	104

RESUMEN

Se realizaron 8 experimentos para determinar los efectos de la textura del endosperma, la humedad de cosecha (HC), el proceso de ensilado, y el agregado de PEG-4000 o urea, sobre el valor nutricional de granos de sorgos. Se evaluaron los efectos de HC (35, 25 y 14%) y humedad de incubación (HI: 0% y la humedad correspondiente a cada momento de cosecha), y del proceso de ensilado (experimentos 1 y 2 respectivamente) de granos con alto (AT) y bajo (BT) contenidos de taninos sobre la desaparición *in situ* (DEGIS) del grano y la concentración final de taninos. El incremento en la HC mejoró la DEGIS en AT y BT, sin efectos de la HI *per se*. El ensilado redujo la concentración de taninos, aumentando la DEGIS. La cosecha anticipada y el consecuente ensilado fueron efectivos para reducir el efecto negativo de los taninos. También se evaluaron los efectos del agregado de PEG-4000 o urea a un grano AT sobre la DEGIS con dos HC y sus interacciones (experimentos 3, 4 y 5). En el experimento 3 se evaluaron las sustancias (PEG-4000 o urea) y dosis (0, 0,1 y 1g PEG-4000/gPB del grano y 0, 2, 4% base MS de urea), y su interacción con HC (35 y 25%, experimento 4). Se obtuvieron mayores DEGIS con 1gPEG-4000 o 2% urea, pero solo con 35%HC. En el experimento 5, se combinaron HC (35 y 25%), dosis de PEG-4000 (0 y 1g/gPB) y ensilado y no ensilado. La DEGIS aumentó con 1g PEG-4000 en granos ensilados y no ensilados con 35%HC. La aplicación de ambas sustancias a granos con 35%HC mejora la DEGIS y el ensilado no modifica la efectividad del PEG-4000.

En el experimento 6 se determinó la digestibilidad aparente *in vivo* (DAIV) y el metabolismo ruminal de tres novillos canulados de rumen alimentados con dietas con sorgos AT sin tratar (testigo) o tratados con PEG-4000 o urea. La DAIV de la PB y el almidón fue de mayor a menor con PEG-4000, urea y testigo, disminuyendo el efecto detrimental de los taninos. Los tratamientos modificaron: pH, N-NH₃, propiónico, valérico, AGV totales, acético/propiónico en rumen, y la urea en plasma.

Los experimentos 7 y 8 evaluaron el efecto del ensilado y la estructura del endosperma sobre los taninos, la fermentación *in vitro* y la producción animal. La producción de gas *in vitro* (PGIV) de endospermas (decorticados) previamente ensilados o no ensilados de tres híbridos: AT-vítreo, AT-harinoso y Blanco (sin taninos), no fue modificada por el ensilado. Solo el endosperma Blanco ensilado presentó un aumento en la tasa de PGIV. Posteriormente, al endosperma de cada híbrido se le agregaron cuatro niveles de taninos (0, 50, 100 y 150%) provenientes de

su pericarpio de granos ensilados y no ensilados. El proceso de ensilado no modificó la actividad inhibitoria de los taninos, y la PGIV fue dependiente de la concentración. En el experimento 8 se engordaron 45 terneras en corrales con tres dietas que contenían 70% de los granos citados anteriormente. Los animales que tuvieron el genotipo Blanco consumieron menos y presentaron mejor eficiencia de conversión que los AT-vítreo y AT-harinoso. La textura del endosperma (AT-vítreo vs AT-harinoso) no produjo ningún efecto.

Palabras clave: taninos, humedad de cosecha, digestión, ganancia de peso, eficiencia de conversión.

ABSTRACT

Eight experiments were carried out to study the effects of the endosperm texture, harvest moisture (HM), ensilage and PEG-4000 or urea treatment on the nutritional value of high moisture sorghum grains with different tannin concentration. The effects of HM and ensiling process (experiments 1 and 2 respectively) of high-tannin (HT) and low-tannin (LT) grain on *in situ* disappearance (ISDEG) and tannin deactivation. Treatments were: HM (35, 25 and 14%), genotype (HT and LT), moisture at the beginning of incubation (MI: moisture incubation: 0% or wet for each harvest time) and their interactions. Increase the HM improved ISDEG in HT and LT, without effects of MI *per se*. Anaerobic storage reduce tannins content, increasing ISDEG. The early harvest and ensiling were effective to reduce the negative effect of tannins on ruminal disappearance. The effect of PEG-4000 or urea added to AT at two HM on ISDEG and their interactions were determined (Experiments 3, 4 and 5). In experiment 3 substances (PEG-4000 or urea) and dose (0, 0,1 and 1g PEG-4000/gCP and 0, 2, 4% urea DM basis) were evaluated, and interaction with HM (35 and 25%, experiment 4). In experiment 5, HM (35 and 25%), PEG-4000 dose (0 and 1g/gCP) and ensiled and non-ensiled storage were combined. Highest ISDEG were obtained with 1gPEG-4000 or 2% urea, but only with 35% HM. The ISDEG was increased with 1g of PEG-4000 under anaerobic or frozen storage with 35% HM. The application of both substances to grains with 35% HC improved ISDEG and ensilage not alters the effectiveness of PEG-4000. In experiment 6 *in vivo* apparent digestibility (IVAD) and ruminal metabolism of three ruminally cannulated steers fed with diets with HT sorghum grains untreated (control) or treated with PEG-4000 or urea were determined. The IVAD of CP and starch was higher with PEG-4000, intermediate urea and lower control, decreasing the detrimental effect of tannins. Treatments modified pH, N-NH₃, propionic, valeric, total VFA, acetic/propionic in rumen, and urea in plasma. The effects of the ensilage on tannins activities and endosperm structure were evaluated in 7 and 8 experiments. *In vitro* gas production (IVGP) of endosperms of grain ensiled and non-ensiled of three hybrids: vitreous HT, floury HT and white (without tannins), were not modified by ensiling. White endosperm ensiled only showed an increase in the rate of IVPG. Subsequently, four levels of tannins (0, 50, 100 and 150%) from its own pericarp from grains ensiled and non-ensiled were added to the endosperms of each hybrids. The ensiling process did not alter the inhibitory activity of the tannins, therefore IVGP was dependent of tannins concentration. Finally, in the experiment 8, 45 calves were

fed in pens with three diets containing 70% of the grains mentioned above. Animals that had the white genotype consumed less and had better feed efficiency than vitreous and floury high tannins sorghum. The endosperm texture had no effect on any variables.

Key words: tannins, harvest moisture, digestion, daily gain, feed conversion.

1. INTRODUCCIÓN

Las características de los sistemas de producción de carne y leche en el mundo se definen generalmente, según los costos de producción y el precio que por dichos productos se obtiene. Para el caso particular de Argentina, las pasturas perennes y/o verdes anuales constituyen la principal fuente de alimentación, lo cual posibilita poder producir carne y leche a bajos costos. A pesar de ello, la utilización de dichos recursos forrajeros es sumamente dependiente de las condiciones climáticas a lo largo del año, no solo en producción sino también en calidad. Esto ocasiona la necesidad de adecuar y/o balancear los nutrientes aportados por la pasturas con el objeto de lograr y mantener altas producciones a través del tiempo. La suplementación con granos de cereales puede ser una estrategia apropiada para lograr dicho objetivo. Por otra parte, los granos de cereales no solo cumplen las funciones como suplementos energéticos en los sistemas pastoriles (Elizalde *et al.*, 1999), sino que además forman parte fundamental de las dietas de sistemas más intensivos de producción de carne, como son los de engorde a corral.

Los granos de los cereales son los más utilizados como fuente principalmente de energía, debido a que se encuentran disponibles en la mayoría de las zonas de producciones mixtas (agrícola-ganaderas) del país. Si se comparan ambos granos, el maíz posee un mayor contenido energético respecto al sorgo (Rooney; Pflugfelder, 1986; Owens *et al.*, 1997), lo cual se refleja en una mejor eficiencia de conversión del alimento (Mc Collough *et al.*, 1972). Sin embargo, el sorgo cuando se lo cultiva presenta algunas ventajas agronómicas asociadas a la rusticidad que, le permiten adaptarse a ambientes bajo condiciones climáticas desfavorables para el cultivo de maíz tales como altas temperaturas, menor fertilidad y condiciones de secano (Stock, 1999).

Los genotipos de sorgo varían respecto a los contenidos de almidón y taninos, a los tipos de proteínas y a la estructura del endosperma, lo cual influencia la digestibilidad traduciéndose en diferencias en las ganancias de peso de los animales que los consumen (Streeter *et al.*, 1990a; Wester *et al.*, 1992; Kotarski *et al.*, 1992; Riffel, 2007).

El almidón del grano de sorgo es considerado como uno de los menos accesibles a la degradación enzimática del animal, debido a que si no es roto durante la masticación opone una gran resistencia que disminuye la digestibilidad (Rooney y Pflugfelder, 1986). Como consecuencia de su pequeño tamaño y de la presencia del

endosperma periférico, el cual se caracteriza por una extremadamente compacta matriz proteica, es indispensable procesar el grano de sorgo para lograr un máximo aprovechamiento por parte del animal. Las diferentes formas de procesar los granos facilitan el acceso a los gránulos de almidón para el ataque enzimático, ya sea por una reducción física del tamaño de las partículas, o solubilizando y desnaturalizando las proteínas del endosperma que mantienen compactados los gránulos de almidón (Owens *et al.*, 1986).

Existen métodos de procesamientos físicos y químicos de complejidad variable que pueden mejorar las características nutricionales de los granos (Hale, 1973; Hinman; Johnson, 1974; McNeill *et al.*, 1975; Stock; Mader, 1987; Owens *et al.*, 1997), pero en el país se recurre casi exclusivamente al molido, quebrado, reconstituido y/o ensilado húmedo de los mismos. El sorgo cosechado con alto contenido de humedad (25 a 35%), aplastado y posteriormente almacenado en condiciones de anaerobiosis es una tecnología que esta en creciente aumento en los sistemas de producción de carne y leche. La humedad con la que se almacena el grano juega un importante rol, y se ha observado en el grano de maíz que cuando la misma está por encima de del 30% el almidón se encuentra en estado amorfo y es altamente digestible tanto en rumen como en el intestino. Sin embargo, si la humedad disminuye por debajo de 22% el almidón ya se encuentra en estado cristalino por lo que se disminuiría su digestibilidad (Sniffen *et al.*, 1996). En el grano de sorgo es posible que se presente el mismo patrón, por lo que sería de esperar que anticipando su cosecha se mejoraría la degradabilidad del almidón. Se ha observado en granos de sorgos cosechados con 14% de humedad, y posteriormente reconstituidos a diferentes humedades y ensilados, que un mayor contenido de humedad mejora las características fermentativas y lo hace más degradable en rumen incrementando la tasa de digestión del almidón (Stock *et al.*, 1987; Huck *et al.*, 1999). Por esa razón, la elección de la humedad más adecuada con la cual se cosechan los granos sería una herramienta a tener en cuenta para mejorar la calidad nutricional del mismo.

El almacenamiento del grano con alta humedad bajo condiciones de anaerobiosis también puede modificar la cantidad de taninos extractables del mismo y de la planta. Los taninos condensados son compuestos secundarios producidos en el grano (Butler *et al.*, 1984), responsables de caracteres agronómicos deseables tales como resistencia del grano al deterioro ambiental, al almacenamiento, al daño por hongos, y bajo determinadas condiciones un cierto grado de resistencia al ataque de pájaros (Stock, 1999). Pero al mismo tiempo, los taninos tienen un impacto negativo

en el grano de sorgo como alimento, ya que ocasionan efectos antinutricionales. Dichos efectos incluyen la disminución de la digestibilidad de las proteínas (Duodu *et al.*, 2003), la tasa de crecimiento, y de la eficiencia de conversión en bovinos (Maxson *et al.*; 1973), y en otras especies como ratas, aves y porcinos (Jambunathan; Mertz, 1973; Cousins *et al.*, 1981; Shirley, 1998). La formación del complejo proteína-tanino, ocasiona una reducción en el aprovechamiento del grano por los animales al verse disminuida su digestibilidad y por lo tanto la disponibilidad del almidón y del nitrógeno para los microorganismos del rumen (Hinders; Eng. 1971; Saba *et al.*, 1972; Hibberd *et al.*, 1982a; Montiel, 2003). Lo anteriormente mencionado destaca el fuerte efecto negativo de los taninos sobre la degradabilidad ruminal de los granos de sorgos, razón por la cual se deberían buscar métodos a través de los cuales se logren disminuir estos efectos, tales como el ensilado y la utilización de sustancias que inactiven el efecto de los taninos.

El ensilado la planta entera de sorgo, disminuye la concentración de taninos en todas las fracciones componentes del silaje. A pesar de ello, el comportamiento de la digestibilidad no fue siempre el mismo, ya que la misma se vio aumentada (Cummins, 1971), o no presentó diferencias (Rodríguez *et al.*, 1998) con la disminución del contenido de taninos. Si bien, Cummins (1971) demostró que no solo se produce una disminución de la concentración de los taninos en las hojas, tallos, glumas y principalmente en los granos con el ensilado, no existen referencias del comportamiento cuando se ensilan únicamente los granos con alto contenido de humedad. Además, tampoco se conoce que efecto tendría el proceso de ensilado interactuando con el genotipo (alto y bajo taninos) y la humedad de cosecha sobre la digestibilidad *in vitro*.

La urea ha sido utilizada para mejorar la preservación de los granos de sorgo cosechados con alto contenido de humedad bajo condiciones de aerobiosis, y para disminuir la concentración de taninos en los mismos. En sorgos cosechados con 12% de humedad y reconstituídos a diferentes niveles humedades (26, 30 y 34%) y almacenados en aerobiosis, previo tratamiento con distintos niveles de urea (2, 3 y 4% de urea en base a materia seca), se logró proveer un adecuado medio de conservación del grano húmedo (Russell *et al.*, 1988), y una rápida inactivación de los taninos, desapareciendo casi en su totalidad a los 21 días post-tratamiento (Russell; Lolley, 1989). La urea desestabilizaría las uniones puente hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas (Kumar; Singh, 1984), las cuales participarían en la formación del complejo proteína-tanino. Esto indicaría que el tratamiento con urea

puede mejorar la digestión del grano de sorgo, pero se desconoce su comportamiento cuando dicho grano se cosecha en forma anticipada con diferentes contenidos de humedad y se conserva bajo condiciones de anaerobiosis.

La formación de complejos entre taninos y otras sustancias puede ser otra vía alternativa para inactivar los taninos. Existen sustancias que actúan como adsorbentes que pueden ser utilizadas con éxito para remover los taninos, y una de ellas es el polietilenglicol (PEG). Este producto comercial disponible en plaza es un polímero sintético y no nutritivo, que contiene en sus cadenas suficientes moléculas de oxígeno que pueden formar fuertes uniones puente hidrógeno con los fenoles y grupos hidroxilos de los taninos (Silanikove *et al.*, 2001). El complejo, que se origina con el tanino ante la presencia del PEG, presenta la particularidad de ser inerte, indigestible y de no metabolizarse en ninguna parte del tracto digestible del animal (Priolo *et al.*, 2000), lo cual presenta la ventaja de ser estable en todo el tracto.

El PEG ha sido usado exitosamente para disminuir el efecto negativo de los taninos y mejorar la digestibilidad de hojas de diferentes especies de árboles y arbustos que poseen una alta concentración de taninos en ovejas (Silanikove *et al.*, 1994; Ben Salem *et al.*, 2000; Piolo *et al.*, 2000; Provenza *et al.*, 2000), cabras (Silanikove *et al.*, 1996 a; Bhatta *et al.*, 2002) y vacas (Landau *et al.*, 2000). Sandoval Castro *et al.* (2003) evaluaron el efecto del PEG 4000 en la neutralización de taninos analizándolo principalmente en hojas de tres arbustos entre los que agregaron también una muestra de grano de sorgo seco. Dichos autores encontrando que la inclusión del PEG aumentó la digestibilidad *in vitro* y la producción de gas de todos los materiales incubados (Sandoval Castro *et al.*, 2003). El PEG 4000 ha sido usado para secuestrar taninos de granos de sorgos secos suministrados en dietas de ratas y pollos. En dichos ensayos se evaluó el efecto sobre la digestibilidad del nitrógeno, la cual se vio aumentada con el agregado de dicho producto solo en sorgos con alto contenido de taninos (Ford; Hewitt, 1979 a, b). Por esa razón, sería importante conocer el efecto del agregado de diferentes dosis de PEG 4000 sobre granos de sorgos almacenados bajo condiciones de anaerobiosis con diferentes contenidos de humedad obtenida por una cosecha anticipada y su comparación con el agregado de urea, sobre la mejora en la degradabilidad *in situ* y la digestión *in vivo* de la materia seca, proteína bruta y almidón en bovinos, como así también las posibles interacciones entre los mismos.

No solo el contenido de taninos afecta el aprovechamiento del grano de sorgo por el animal. La estructura del endosperma determina sus características físico-químicas que pueden afectar la digestión del mismo y por consiguiente podrían tener

un impacto sobre la performance animal. La dureza o vitrosidad (proporción de endosperma córneo) juega un rol importante en la degradación ruminal del almidón, encontrándose estas variables inversamente correlacionadas (Philippeau; Michalet-Doreau, 1997; Philippeau *et al.*, 1998). Por su parte, Streeter *et al.* (1990c, 1991) detectaron diferencias tanto en el sitio como en la extensión de la digestión en novillos entre híbridos de sorgo que diferían en la textura del endosperma. Miller *et al.* (1972) observaron que los genotipos de sorgo con mayor proporción de endosperma harinoso alcanzaron una mayor digestibilidad *in situ* respecto a aquellos más vítreos, encontrando diferencias de hasta un 34%. Esto indicaría que la textura sería otro factor a tener en cuenta para mejorar la digestión del grano, sin olvidar que el mismo puede interaccionar con el contenido de taninos. En consecuencia, resulta importante conocer cual sería la performance de animales alimentados a corral con sorgos altos en taninos y procesados a través del ensilado con alto contenido de humedad que sean, a su vez, contrastantes en su textura del endosperma (córneo y harinoso). También se propone comparar dichos genotipo con un sorgo blanco y sin taninos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Constitución y composición de los granos de sorgo.

El grano de sorgo es un fruto simple denominarlo cariopse (Evers *et al.*, 1999) que esta constituido por tres componentes principales: una capa protectora que los recubre o pericarpio, el germen o embrión y el tejido de almacenamiento o endosperma (Figura 1; Rooney; Clark, 1968; Rooney; Miller, 1981; Waniska, 2000). El componente más importante de los tres es el endosperma, que representa entre un 80 a 85% del peso, seguido por el embrión (7 a 12%) y la cubierta seminal que no supera el 8% (Hubbard *et al.*, 1950).

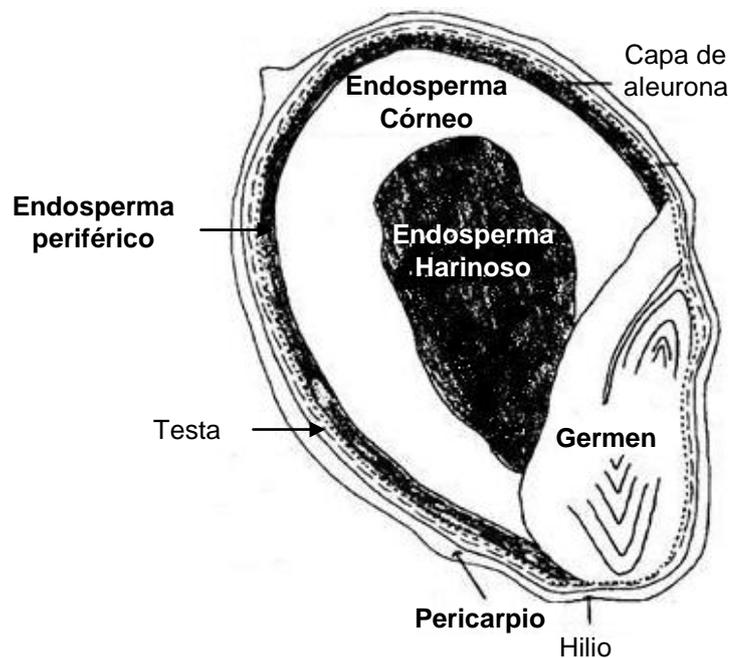


Figura 1: Diagrama de un cariopse de sorgo (Adaptado de Waniska, 2000).

El endosperma está constituido por áreas bien definidas: una córnea o vítrea y otra harinosa, las cuales están rodeadas por una zona periférica o subaleurona, denominada endosperma periférico (Kotarski *et al.*, 1992). La proporción en la que se encuentran cada una de dichas áreas varía según el híbrido que se considere (Chandrashekar; Hazhar, 1999). El endosperma, tanto vítreo como harinoso, esta

compuesto por gránulos de almidón, la matriz proteica y los cuerpos proteicos, y la proporción de cada uno de ellos como así también su tamaño depende del lugar en donde se ubiquen (porción vítrea o harinosa). La naturaleza y la composición de la matriz proteica tienen un profundo efecto sobre las características físicas del endosperma y la exposición de los gránulos de almidón a la digestión enzimática (Rowe *et al.*, 1999).

El sorgo tienen una mayor proporción de endosperma periférico respecto a otros granos, y el mismo está conformado por las primeras dos a seis capas de células que se encuentran por debajo de la capa de aleurona (Sullins; Rooney, 1975), la cual es extremadamente dura, densa y resistente a la entrada del agua (Waniska, 2000). El endosperma periférico contiene mayor cantidad de cuerpos proteicos compuestos principalmente de prolaminas o kafirinas, la principal proteína presente en el grano de sorgo (proteína estructural). Además, los gránulos de almidón son más pequeños que los del endosperma córneo propiamente dicho. Como consecuencia de la alta concentración de cuerpos proteicos en el área periférica, el almidón prácticamente no está disponible para la degradación enzimática (Sullins; Rooney, 1975).

Los gránulos de almidón en los endospermas periférico y córneo están rodeados por cuerpos proteicos y se encuentran embebidos en una densa y continua matriz proteica, siendo esta última más densa en el periférico. El endosperma harinoso, el cual está localizado en el centro del grano, posee gránulos de almidón más grandes y en mayor cuantía que en los otros endospermas, y la matriz proteica que los rodea es discontinua y con menor cantidad de cuerpos proteicos (Sullins; Rooney, 1974; Rooney; Pflugfelder, 1986; Kotarski, *et al.*, 1992). Además, dicho endosperma, presenta espacios de aire por el menor empaquetado de los gránulos de almidón (Waniska, 2000), los cuales son más susceptibles a acciones externas como el procesamiento de los granos o la digestión enzimática (Huntington, 1997).

Por último, la cubierta seminal está dividida en dos partes: pericarpio y testa (Figura 1). Esta última se halla inmediatamente por debajo del pericarpio y rodea a la capa de aleurona. La testa puede estar completa, estar en forma esporádica o completamente ausente en algunos sorgos (Salunkhe *et al.*, 1989). El contenido de taninos en el sorgo está influenciado por la extensión de la testa en el grano, y los que no poseen testa son aquellos que no contienen taninos (Hahn *et al.*, 1984).

2.2 Factores que afectan el valor nutritivo del grano de sorgo

El valor nutritivo del grano de sorgo puede estar determinado por diferentes factores entre los cuales se pueden mencionar el tipo y textura del endosperma, el método de procesamiento y la presencia de taninos condensados.

2.2.1. Tipo y textura del endosperma

El principal componente químico de la materia seca de los granos de sorgo es el almidón, y puede variar entre un 70 a 80% (Rooney; Pflugfelder, 1986). El mismo está compuesto por dos moléculas principales, amilosa y amilopectina, y la proporción de ambas en los gránulos de almidón determina la tasa y la extensión de la digestión (Rowe *et al.*, 1999). La amilosa es un polímero lineal compuesto de unidades de D-glucosa unidas por enlaces tipo α -1,4 (Rooney; Pflugfelder, 1986; Kotarski, *et al.*, 1992; Evers *et al.*, 1999). La proporción de amilosa en el almidón puede variar entre un 0 a 30%, dependiendo de la especie y de la variación genética dentro de la especie (Rooney; Pflugfelder, 1986; Kotarski, *et al.*, 1992). La amilopectina es un polímero ramificado y comprende entre el 70 y 80% del almidón de los granos. Está formada por una cadena lineal de unidades α -1,4-D-glucosa y ramificaciones α -1,6 cada 20 o 30 moléculas de glucosa, las que constituyen entre 4 o 5% del número total de uniones de la amilopectina (Rooney; Pflugfelder, 1986).

La textura del endosperma está referida a la proporción relativa de endosperma corneo o vítreo sobre el endosperma harinoso dentro del grano (Rooney; Miller, 1981). La misma determina la dureza o vitrosidad de los granos, y se conoce que cuando predomina el endosperma vítreo por sobre el harinoso el grano será más duro. La vitrosidad del grano juega un rol muy importante en la degradación del almidón, encontrándose estas variables inversamente correlacionadas (Philippeau; Michalet-Doreau, 1997; Philippeau *et al.*, 1998). Esto último está relacionado con la continuidad de la matriz proteica y con el tipo de proteínas presentes en el grano. En el endosperma vítreo la matriz proteica es del tipo continua, mientras que en el harinoso la misma es discontinua, esto hace que los gránulos de almidón estén menos o más expuestos a los microorganismos respectivamente (Kotarski *et al.* 1992; Philippeau *et al.*, 1999). Además, Chandrashekar; Mazhar (1999) demostraron que un grano más

duro deposita una mayor cantidad de cuerpos proteicos y de prolaminas que uno más blando. Por su parte, Abdelrahman; Hoseney (1984) concluyeron que las prolaminas son las responsables de conferirle dureza al grano y menor digestibilidad. En grano de sorgo, Miller *et al.* (1972) observaron que los genotipos con mayor proporción de endosperma harinoso alcanzaron una mayor digestibilidad *in situ* respecto a aquellos más vítreos, encontrando diferencias de hasta un 34%. Por su parte, Samford *et al.* (citados por Waldo, 1973) hallaron que los sorgos con textura córnea y harinosa presentaron porcentajes de digestión del almidón a nivel ruminal de 48 y 80% respectivamente. Hibberd *et al.* (1982a, 1985) utilizando sorgos secos y reconstituídos, con alto contenido de taninos, hallaron que los genotipos harinosos presentan una mayor disponibilidad de almidón, reflejada por una mayor tasa de producción de gas *in vitro*, respecto a otros genotipos con endosperma más duro. Por su parte Streeter *et al.* (1990c, 1991) hallaron diferencias en el sitio y la extensión de la digestión en novillos entre híbridos de sorgo que diferían en la textura del endosperma. Todo ello indicaría que pueden ser detectadas diferencias entre genotipos con distinta textura del endosperma a través de evaluaciones *in situ*, *in vitro* e *in vivo*.

2.2.2. Método de procesamiento

Un grano entero con el pericarpio intacto es muy resistente a la digestión ruminal, debido a que al estar entero es extremadamente difícil la fijación bacteriana (McAllister *et al.*, 1994; Beauchemin *et al.*, 1994). La ruptura de la barrera física que recubre los granos a través del procesamiento, no solo reduce el tamaño de partículas, sino que también incrementa la superficie de contacto disponible para la unión de los microorganismos y el ataque enzimático (McAllister *et al.*, 1994).

La utilización del almidón puede mejorar sustancialmente a través del procesamiento de los granos, y la magnitud de la mejora depende de la fuente de grano y del método de procesamiento empleado. La eficiencia de utilización del almidón está directamente relacionada con el efecto que el procesamiento puede ejercer sobre la integridad o solubilidad de la matriz proteica que encapsula los gránulos de almidón (McNeill *et al.*, 1975).

El principal efecto del procesado de los granos es alterar el sitio de digestión del almidón, aumentando la digestión ruminal en desmedro de la intestinal, con un consecuente incremento adicional en el porcentaje digerido en ambos sitios (Theurer, 1986). El almidón de los granos de sorgo es generalmente considerado como menos

accesible a la degradación enzimática del animal que el de otros granos (Rooney; Pflugfelder, 1986, Stock; Mader, 1987) y varía inversamente con el tamaño de la partícula del grano (Galyean *et al.*, 1981). Por lo tanto, cualquier mejora en la digestión ruminal del grano a través del procesamiento aumentaría la eficiencia de utilización por parte de los animales.

La magnitud de la mejora en la utilización del almidón con el procesamiento es inversamente proporcional a la digestibilidad del almidón de los granos sin procesar y a la intensidad del procesamiento, por esa razón el sorgo es uno de los granos que más responde al procesamiento (Theurer, 1986). Esa mayor respuesta parece estar asociada con una mayor utilización del almidón causada por la rotura de la matriz proteica, la cual es más densa en el sorgo respecto a otros granos. (McNeill *et al.*, 1975; Rooney; Pflugfelder, 1986).

Existen varios métodos de procesamiento para mejorar la digestibilidad y el valor alimenticio del grano de sorgo. El procesamiento del grano de sorgo puede realizarse en seco (quebrado o molido), en presencia de humedad (grano húmedo por la cosecha anticipada o reconstituido por el agregado de agua al grano seco) o mediante la combinación de humedad y temperatura (rolado al vapor, flaqueado al vapor o micronizado). Owens *et al.* (1997) realizaron una revisión de 130 ensayos de alimentación a corral donde utilizaban grano de sorgo procesado de diferentes formas (rolado seco, grano húmedo y rolado al vapor). La eficiencia de conversión y la concentración energética del grano mejora en la medida que se utiliza un método de procesamiento más agresivo, es decir el rolado al vapor genera una mayor utilización de los nutrientes seguido por el grano húmedo y el rolado seco en última instancia (Owens *et al.*, 1997).

El silaje de grano húmedo consiste en la cosecha anticipada del grano para posteriormente conservarlo bajo condiciones de anaerobiosis. Este método de procesamiento presenta una serie de ventajas técnicas y nutricionales respecto a la cosecha y posterior utilización del grano seco. Por un lado permite desocupar antes el lote, reducir pérdidas de cosecha y eliminar costos de secado (Stock; Mader, 1987) y, por otra parte mejora la digestión del almidón (Simpson *et al.*, 1985) y la eficiencia de conversión del grano (Riggs; McGinty, 1970; Simpson *et al.*, 1985; Stock; Mader 1987). Los métodos de procesamiento que involucran la humedad (grano húmedo o reconstituido) resultan en una mejora en la eficiencia alimentación entre un 12 a 15% en el grano de sorgo. Riggs; McGinty (1970) realizaron varios ensayos de alimentación y encontraron un rango de 7 a 15% en la mejora en la eficiencia de conversión del

grano húmedo respecto al seco. Simpson *et al.* (1985) hallaron una mejora del 11 al 18% en la eficiencia de conversión a favor de los novillos alimentados con grano húmedo. Por su parte, Stock; Mader (1987) recopilaron una serie de ensayos y encontraron que el porcentaje de mejora en la eficiencia de alimentación del grano húmedo varía entre un 8 a un 20% respecto al grano seco.

2.2.3. Taninos

Todos los granos de sorgo contienen compuestos fenólicos, los cuales pueden modificar su color, apariencia y la calidad nutricional. Los compuesto fenólicos pueden ser divididos básicamente en tres grupos: ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Hahn *et al.*, 1984). Los ácidos fenólicos se encuentran en todos los tipos de sorgos, mientras que los flavonoides no son siempre detectados. Los taninos se presentan concentrados en la testa de la semilla (Figura 1), la cual es un tejido altamente pigmentado (Magalhães *et al.*, 1997); aunque también se han encontrado pero en menor medida en el endosperma del grano (Saba *et al.*, 1972).

Los ácidos fenólicos no tienen efecto sobre la calidad nutricional del grano, solo pueden causar un color indeseable en los alimentos cuando son procesados bajo condiciones alcalinas. Al igual que los ácidos fenólicos, los flavonoides, en el caso en que se hallen presentes, no parecen tener efectos sobre la digestibilidad ni la palatabilidad de los granos (Magalhães, *et al.*, 1997).

Los taninos son compuestos secundarios producidos por algunas plantas, que no están involucrados en ninguna vía metabólica que provea energía para el crecimiento y la reproducción de la plantas (Butler *et al.*, 1984). Basándose en su estructura química, se pueden definir como sustancias polifenólicas de alto peso molecular (500-20000 Da; McLeod, 1974; Hagerman; Butler, 1981), que tienen la capacidad de formar complejos reversibles e irreversibles principalmente con las proteínas debido a la presencia de un gran número de grupos hidroxilos fenólicos (Hagerman; Butler, 1981; Kumar; Singh, 1984; Magalhães, *et al.*, 1997). Además de las proteínas, los taninos pueden acomplejar otras sustancias como polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectina, etc.), alcaloides, ácidos nucleicos y minerales (McLeod, 1974; Schoefield *et al.*, 2001). La reactividad que poseen los taninos con moléculas de significancia biológica tiene importancia desde el punto de vista

nutricional, debido a que interfieren en el aprovechamiento de las mismas (Schoefield *et al.*, 2001).

Los taninos pueden ser clasificados en dos tipos: taninos hidrolizables (poliésteres de ácido gálico y varios azúcares individuales) y taninos condensados (Shirley, 1998; McSweeney *et al.*, 2001). No hay evidencias de la presencia de taninos hidrolizables en los sorgos, mientras que los condensados son aquellos que se presentan en los sorgos denominados antipájaros (Magalhães *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista de la producción de granos, los taninos que se almacenan principalmente en la testa, le otorgan ventajas agronómicas como la resistencia al daño por mohos e insectos y, en algunos casos, a la depredación por pájaros. Además les confieren una calidad favorable de almacenamiento al grano, y una mayor resistencia al deterioro ambiental (Hahn *et al.*, 1984). Al mismo tiempo, los taninos tienen un impacto negativo en el grano de sorgo como alimento, ya que presentan un efecto antinutricional. Dicho efecto es causado por la formación del complejo proteína-tanino, el cual ocasiona una disminución en el aprovechamiento del grano por los animales al verse disminuida su digestibilidad y por lo tanto la disponibilidad de nitrógeno para los microorganismos del rumen. El impacto del contenido de taninos incluye la disminución de la digestibilidad de las proteínas (Duodu *et al.*, 2003), la tasa de crecimiento, y de la eficiencia de conversión en bovinos (Maxon *et al.*, 1973), y en otros animales como ratas, aves y porcinos (Jambunathan; Mertz, 1973; Cousins *et al.*, 1981; Shirley, 1998).

2.3. Taninos condensados en el grano de sorgo

Los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas o procianidinas, son oligómeros o polímeros no ramificados de flavonoides, flavan-3-ol y/o flavan-3,4-diol: epicatequina y catequina (Figura 2a) unidos principalmente por uniones entre C4→C8 (Dykes; Rooney, 2006). Las proantocianidinas presentes en el grano de sorgo son del tipo B, con unidades de extensión de (-)-epicatequinas, siendo las catequinas las unidades terminales (Gu *et al.*, 2002, Figura 2b).

El color del pericarpio del grano de sorgo no es un indicador confiable de la presencia de taninos en el mismo. Boren; Waniska (1992) evaluaron el contenido de taninos en un amplio rango de variedades de sorgo que diferían en el color del

pericarpio, demostrando que el color del pericarpio y su intensidad no es un buen indicador del contenido de taninos. Los sorgos con colores de pericarpios blanco, amarillo, rojo o marrón pueden o no tener taninos condensados, dependiendo esto de la presencia de una testa pigmentada (Dykes; Rooney, 2006).

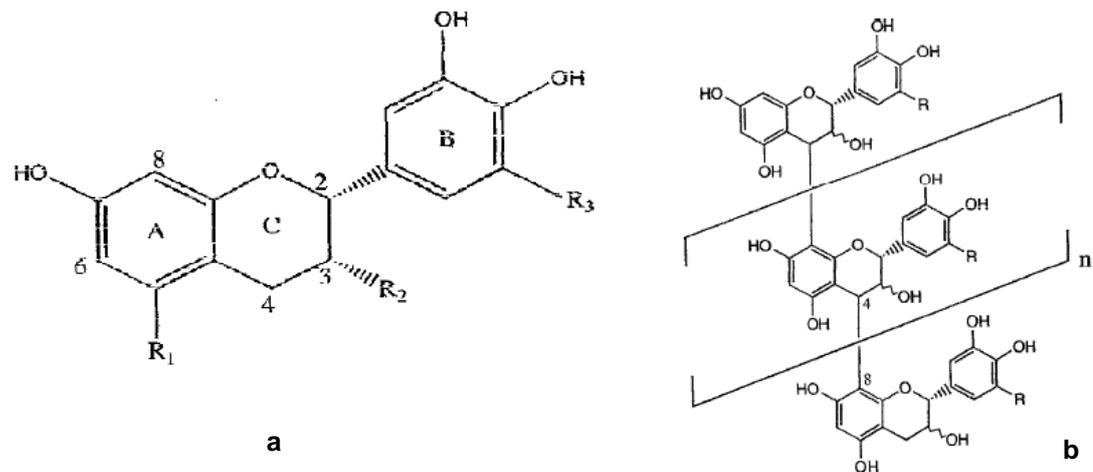


Figura 2: Estructura molecular de un flavonoides (a) y de los taninos condensados (b) (Schofield *et al.*, 2001).

De acuerdo a lo propuesto por Rooney; Miller (1982), los híbridos de sorgo pueden ser divididos en tres tipos según la constitución genética y análisis químicos. Los sorgos tipo I son aquellos genotipos que no tienen una testa pigmentada, y contienen bajo niveles de fenoles, pero no tienen taninos. En los tipos II y III, ambos tienen una testa pigmentada y contienen taninos, pero se diferencian en la extractabilidad y en la manera en que se depositan en los granos. Los taninos de los sorgos tipo II son extraídos con metanol acidificado, mientras que los tipo III son extraídos con metanol acidificado y con metanol solo (Dykes; Rooney, 2006). Respecto a las zonas donde se depositan los taninos, Earp *et al.* (2004) demostraron que en los sorgos tipo II y III se depositan de manera diferente. En los granos de sorgo del tipo II los taninos son depositados en vesículas dentro de la capa de la testa, mientras que los taninos en el tipo III son depositados a lo largo de las paredes celulares de la testa y algunos están presentes en el pericarpio (Earp *et al.*, 2004). Eso explicaría la necesidad de utilizar ácido para romper la estructura de las vesículas, liberando los taninos en los sorgos tipo II (Earp *et al.*, 2004).

En general, la presencia de taninos en el alimento puede ser benéfica o detrimental para los rumiantes, dependiendo de los tipos y la cantidad que es consumida, y de la fisiología de la especie que la consume (Mueller-Harvey, 2006). En el caso particular del grano de sorgo, uno de los principales efectos biológicos que presentan los taninos está dado en la capacidad que tienen los mismos para unirse a las proteínas, no solo del grano sino también las presentes en las dietas (Butler *et al.*, 1984). Ante condiciones óptimas, los taninos del grano de sorgo pueden unirse y precipitar proteínas hasta 12 veces su propio peso (Hagerman; Butler, 1980), hallazgo que es muy importante desde el punto de vista nutricional. Debido a que el grano de sorgo contiene entre un 8 a 10% de proteína, los taninos presentes en los granos altos en taninos serían suficientes como para capturar toda la proteína del grano y afectar negativamente su disponibilidad, además de ligarse a proteínas exógenas (Butler *et al.*, 1984).

Como se indicó anteriormente, los taninos tiene una elevada afinidad por las proteínas debido a la presencia de un gran número de grupos fenólicos que proveen numerosos puntos para formar enlaces con los grupos carbonilos de los péptidos (Kumar; Singh, 1984). Kumar; Singh (1984) sugirieron que pueden producirse cuatro tipos de enlaces para la formación del complejo entre la proteína y el tanino:

- 1) Puentes de hidrógeno: es un enlace que se produce entre los radicales hidroxilos de los grupos fenólicos y el oxígeno del grupo carbonilo de los péptidos de las cadenas proteicas.
- 2) Interacciones hidrofóbicas: entre el anillo aromático del compuesto fenólico y las regiones hidrofóbicas de la proteína.
- 3) Enlaces iónicos: entre el grupo aniónico del tanino y el grupo catiónico de la proteína.
- 4) Enlaces covalentes: formados por la oxidación de los polifenoles a quinonas y su posterior condensación con un grupo nucleofílico de la proteína (-SH, -NH₂, -OH).

En relación a las interacciones entre las proteínas y los taninos, es importante señalar que las uniones por puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas son las más frecuentes en relación a las iónicas y covalentes (Spenser *et al.*, 1988). Para el caso particular del grano de sorgo, Butler *et al.* (1984) señalaron que las asociaciones entre los taninos y las proteínas tendrían lugar mediante puentes de hidrógeno e

interacciones hidrofóbicas, sin encontrarse evidencias de que se produjesen enlaces covalentes ni enlaces iónicos entre ambas moléculas.

El concepto de la interacción entre la proteína y el tanino es altamente dependiente tanto de la proteína como del tanino (Asquith; Butler, 1986). Los factores que determinan la menor o mayor afinidad de las proteínas por los taninos ha sido estudiado por Hagerman; Butler (1981), quienes señalaron que los taninos condensados pueden precipitar una proteína en particular en presencia de una gran cantidad de otros diferentes tipos. Las proteínas difieren marcadamente en cuanto a su afinidad por los taninos, y especificidad de la interacción está en función del tamaño, la conformación y la carga de las moléculas. En general, las proteínas que se unen fuertemente a los taninos del sorgo son relativamente grandes, con una estructura flexible y abierta, y ricas en el aminoácido prolina (Hagerman; Butler, 1981). Todas esas características maximizan la oportunidad de formar múltiples puentes de hidrógeno e interacciones no polares entre las moléculas de taninos y los péptidos de las proteínas (Hagerman; Butler, 1981). Estudios realizados mediante electroforesis, indicaron que los taninos estuvieron predominantemente asociados con la fracción kafirinas (proteínas ricas en prolinas), alterando su solubilidad y digestibilidad (Taylor *et al.*, 2007). Las kafirinas, proteínas ricas en prolinas, tienen una alta capacidad de unirse a los taninos (Guiragossian *et al.*, 1978), por lo que la mayor proporción de los taninos de un grano se encuentran principalmente asociados a las mismas (Neucere; Sumrell, 1980), lo cual provocaría una disminución de la disponibilidad de las mismas en genotipos que posean una alta concentración de taninos.

De acuerdo a lo propuesto por Jones; Mangan (1977), la formación de los complejos entre los taninos y las proteínas resultan estables e insolubles en rangos de pH que están comprendidos entre 3,5 y 7, trabajando con taninos condensados de *Onobrychis viciifolia* Scop. y como fuentes proteicas la rubisco y mucoproteínas de la saliva bovina. Esto ocasiona que los complejos sean estables a pH ruminal, se disocian a un pH inferior a 3,5 (como es el pH del abomaso: 2,5-3) o superior a 8 (como serían los pH del duodeno: cercano a 8) (Hagerman *et al.*, 1992; Barry; McNabb, 1999). A pesar de ello, McNabb *et al.* (1998) indicó que al inicio del intestino delgado (duodeno), el pH es de aproximadamente 5,5 lo cual podría permitir la formación nuevamente del complejo proteína-tanino impidiendo la digestión. Los taninos también serían capaces de inhibir enzimas digestivas, mediante la formación con las mismas de complejos inactivos o insolubles (Kumar; Singh, 1984). Por su parte, Carrulla (1994) sugirió que posiblemente de todas las uniones entre las

proteína y los taninos a bajos pH no sea completa la ruptura tal como sugieren Jones; Mangan (1977). Otros autores indicaron que los taninos que fueron liberados antes de alcanzar el intestino pueden inhibir la actividad de enzimas digestivas (tripsina y amilasa) en ovejas (Silanikove *et al.*, 1993) y cabras (Silanikove *et al.*, 1996b). En su trabajo con taninos procedentes de *Desmodium intortum* y *Lotus pedunculatus*, Perez-Maldonado *et al.*, 1995, indicaron que los taninos difieren en su habilidad para unirse a las proteínas ante el pH presente en el rumen y también en la reversibilidad del proceso a nivel post-ruminal. Esto indicaría que el rango de pH que establece la estabilidad del complejo entre la proteína y el tanino puede ser altamente dependiente de los tipos de proteínas y de taninos involucrado, y que a pesar de la ruptura del complejo los taninos pueden continuar el efecto negativo sobre las enzimas digestivas.

2.4 Efecto de los taninos del grano de sorgo sobre la digestión y respuesta animal

Los efectos antinutricionales de los taninos presentes en el grano de sorgo incluyen la disminución de la digestibilidad de las proteínas, la tasa de crecimiento, y de la eficiencia de conversión no solo en bovinos (Maxson *et al.*; 1973; Montiel, *et al.*, 2006; Riffel, 2007), sino también en otras especies animales como ratas, aves y porcinos (Jambunathan; Mertz, 1973; Ford; Hewitt, 1979; Mitaru *et al.*, 1983; Cousins *et al.*, 1981; Nyachotti *et al.*, 1997; Shirley, 1998). Además, Hagerman; Butler (1991) concluyeron que las consecuencias biológicas de los taninos dependerán de su composición química y estructura, del resto de los componentes de la dieta y de la especie animal que los consuma.

La digestibilidad y la eficiencia de utilización de los nutrientes pueden verse disminuidas entre un 3 a un 15% cuando el grano contiene taninos (Waniska, 2000), afectando también la degradabilidad del almidón. La presencia de taninos en el grano disminuyó la producción de gas *in vitro* hasta en un 50% (Hinders; Eng, 1971; Saba *et al.*, 1972; Hibberd *et al.*, 1982a). Por su parte, Montiel (2003), evaluando 14 híbridos de sorgos que diferían en la cantidad de taninos, halló que el almidón de los genotipos con alto contenido de taninos fue un 32% menos degradable en el rumen respecto a los bajo en taninos. Además, el contenido de taninos fue, entre todos los parámetros físico-químicos evaluados en los granos, la variable que mejor se correlacionó con la degradabilidad ruminal del almidón ($r=-0,86$). Dürselen (1988) comparó un sorgo alto

taninos vs. uno bajo en taninos evaluando la digestión *in vivo* en corderos. Dicho autor indicó que no solo la digestión total del almidón se ve disminuida por la presencia de taninos, sino también la disponibilidad de nitrógeno.

Los taninos también tienen la capacidad de alterar de manera negativa los procesos digestivos, al acomplejarse también con enzimas secretadas o con proteínas endógenas del sistema digestivo (Butler, citado por McSweeney, 2001). En experimentos llevados a cabo *in vitro*, se ha observado los taninos inhiben varias enzimas, incluyendo enzimas digestivas como la tripsina y la α -amilasa (Griffiths; Mosely, citados por Butler *et al.*, 1984). Los taninos son considerados como inhibidores del crecimiento bacteriano debido a que tienen la capacidad de reaccionar con la pared celular de las bacterias y las enzimas extracelulares secretadas por ellas. Cualquiera de las dos interacciones inhiben el transporte de nutrientes hacia el interior de la célula bacteriana, y esto es lo que ocasiona un retardo en el crecimiento de los microorganismos ruminales y una disminución en la digestión (McSweeney, 2001).

La respuesta animal también es afectada por la presencia de taninos en el grano de sorgo. Maxon *et al.* (1973) engordaron a corral novillos (300 kg de peso inicial) con dietas ofrecidas a voluntad que tenían 78% de grano de sorgo con o sin taninos según el tratamiento. Dichos autores concluyeron que aquellos animales que se alimentaron con el grano alto en taninos debieron consumir un 31% más de ración para alcanzar la misma ganancia diaria de peso vivo respecto a los sin taninos. Gran parte de la variación en la performance animal puede ser explicada por diferencias entre los genotipos en los sitios y la extensión de la digestión (Maxon *et al.*, 1973). La fermentación ruminal del almidón difirió en un 25% entre híbridos (Hibberd *et al.*, 1985), siendo las más alta en los sorgos sin taninos. Utilizando sorgos contrastantes en la concentración de taninos (alto vs bajo) en ensayos de terminación, McCollough *et al.* (1972b) hallaron que los novillos alimentados con sorgo altos en taninos fueron los menos eficientes en convertir el alimento, requiriendo 1,62 kg más de ración para producir un kilo de ganancia respecto a los alimentados con sorgo bajo en taninos. Esto fue similar a lo hallado por Riffel (2007) quien indicó diferencias en las eficiencias de conversión, siendo las mismas de 6,7 y 5,8 (kg consumido/ kg ganado) para las dietas con grano húmedo de sorgos alto y bajo en taninos, respectivamente. Lo anteriormente mencionado destaca el fuerte efecto negativo de los taninos presentes en el grano de sorgo sobre la degradabilidad ruminal y la performance animal. Por esta razón, deberían buscarse métodos a través de los cuales se logren disminuir o anular dichos efectos cuando no se puede optar por híbridos bajo en taninos.

2.5. Métodos para remover o inactivar taninos

En los últimos años se han centrado esfuerzos en encontrar métodos, en lo posible rápidos y sencillos, que permitan reducir o inactivar el efecto de los taninos en el grano de sorgo. Dichos métodos podrían abarcar desde el almacenamiento del grano húmedo antes condiciones de anaerobiosis hasta el empleo de sustancias que inactiven el efecto negativo de los taninos.

2.5.1 Almacenamiento del grano con alto contenido de humedad y bajo condiciones de anaerobiosis.

El contenido de taninos extractables del grano de sorgo ha sido marcadamente reducido embebiendo los granos únicamente con agua y almacenándolos en una atmosfera con CO₂ (Reichert *et al.*, 1980). Esta misma tendencia se observó en hojas de acacia (Ben Salem *et al.*, 2005a) o de roble (Makkar; Singh, 1993) que fueron almacenadas en anaerobiosis, indicando que el ensilado de especies arbustivas que presentan alta concentración de taninos sería una técnica para mejorar su valor nutritivo.

El alcance de la reducción del contenido de taninos en el grano de sorgo es dependiente del tiempo de almacenaje, la temperatura y la cantidad de agua agregada (Reichert *et al.*, 1980). Esto se vio reflejado en una mejora en la ganancia de peso y la eficiencia de conversión en ratas que fueron alimentadas con sorgos altos en taninos (Reichert *et al.*, 1980). En otras especies animales como pollos (Mitaru *et al.*, 1983; Sarani *et al.*, 1984) y cerdos (Mitaru *et al.*, 1984 b, c) han sido obtenidos resultados similares, atribuidos a una mejora en la digestibilidad de los nutrientes, en particular de la proteína, cuando se reconstituye un grano y se almacena en condiciones de anaerobiosis. Teeter *et al.* (1986) concluyeron que agregando agua al grano hasta alcanzar un 70% de materia seca con una subsecuente incubación anaeróbica a 32°C, puede remover casi la totalidad de los taninos químicamente extractables. Además, dichos autores expresaron que la tasa de eliminación de los taninos está altamente influenciada por el híbrido (Teeter *et al.*, 1986). La fermentación podría modificar la estructura y reactividad de los taninos, lo que mejora el valor nutricional del grano (Jansman, 1993).

También ha sido demostrado que, cuando se ensila la planta completa de sorgo, se produce una disminución de la concentración de taninos en todas las fracciones componentes del silaje. Cummins (1971) evaluó el efecto del proceso de ensilado de dos híbridos de sorgos (alto y bajo taninos) sobre el contenido de taninos y la digestibilidad *in vitro* de la materia seca, por la técnica de Tilley; Terry (1963), en diferentes fracciones de la planta. El proceso de ensilado no modificó el porcentaje de taninos ni la digestibilidad *in vitro* de la materia seca sobre el componente granos en el genotipo bajo en taninos. Sin embargo, dicho autor concluyó que el efecto depresivo de los taninos sobre la digestibilidad disminuye con el proceso de ensilado, hallando una reducción del 61% en el contenido de taninos y un aumento del 32% en la digestibilidad *in vitro* en el grano de sorgo con alto contenido de taninos (Cummins, 1971).

El nivel de taninos usualmente se reduce cuando se ensila la planta entera de un genotipo de sorgo alto en taninos. A pesar de ello, el comportamiento de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca no fue siempre el mismo, ya que la misma si bien aumentó con la disminución del contenido de taninos en el silaje (Cummins, 1971), en otro trabajo no presentó diferencias luego del proceso fermentativo en dos genotipos altos en taninos (Rodríguez *et al.*, 1998). Si bien, Cummins (1971) demostró que no solo se produce una disminución de la concentración de los taninos en las hojas, tallos, glumas y principalmente en los granos con el ensilado, no existen referencias del comportamiento cuando se ensila únicamente el grano con alto contenido de humedad.

2.5.2. Tratamiento con urea.

La cosecha anticipada del grano húmedo trae aparejado inconvenientes en su almacenamiento cuando el mismo es ante condiciones de aerobiosis, ya que el mismo puede deteriorarse debido al desarrollo de microorganismos indeseables (Hill *et al.*, 1991). Para sobreponer esos inconvenientes, se ha utilizado la urea, sustancia que tiene el potencial de preservar el grano cuando se almacena en un ambiente aeróbico. Russell *et al.* (1988) evaluaron, en laboratorio y en experimentos a campo, la efectividad de la urea para preservar el grano con alta humedad y su potencial utilidad en el uso en dietas de rumiantes. Para ello reconstituyeron granos con agua o con soluciones que contenían urea, alcanzando los niveles de humedad de 22, 28 y 34% y de urea de 0, 2, 4 y 6 % en base a la materia seca, respectivamente. Dichos autores

hallaron que la urea en presencia de humedad se hidroliza y se transforma en NH_3 , aumentando el pH hasta alcanzar valores entre 8 y 9. Este medio, rico en amoníaco, se torna desfavorable para el desarrollo de la microflora fúngica y bacteriana responsable de la putrefacción del grano cuando se almacena en presencia de oxígeno y con alta humedad (Ørskov *et al.*, 1974; Russell *et al.*, 1988). Además, la presencia de urea no afectó la aceptabilidad por los novillos alimentados con dicho grano (Russell *et al.*, 1988).

Existen antecedentes sobre el uso de la urea para provocar el ablandamiento del pericarpio del grano por el amoníaco producido (Russell *et al.*, 1988), lo que haría innecesaria la molienda o partido del mismo para mejorar la digestión por bovinos. Russell *et al.* (1988) atribuyeron este efecto a la ruptura del pericarpio, observada a través de microscopía electrónica, como la responsable de las diferencias halladas en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca entre los granos tratados y no tratados. A pesar de ello, los resultados no son consistentes con las respuestas cuando se prueban en ensayos de producción. En engorde a corral, Pordomingo; Juan (2000), compararon el agregado de urea sobre el ablandamiento del pericarpio en un genotipo de grano húmedo de sorgo entero y otro partido. Dichos autores no hallaron efecto de la urea sobre los granos enteros y los animales que consumieron dichas dietas tuvieron menores ganancias de peso y menores eficiencias de conversión respecto a los que consumieron el grano partido. En un ensayo previo, Juan *et al.* (1998), evaluaron el efecto de la urea en un grano de sorgo cosechado húmedo entero vs el mismo grano de sorgo pero seco y molido. Los animales que consumieron el grano entero presentaron una alta pérdida del mismo en las heces, lo cual fue en detrimento de la ganancia de peso y la eficiencia de conversión (Juan *et al.*, 1998). Comparando un sorgo cosechado con humedad alto en taninos molido vs el mismo genotipo pero tratado con urea y suministrado entero, Romero *et al.* (2001) no lograron modificar la producción de leche con el tratamiento con urea. Esto indicaría, que si bien la urea puede producir un ablandamiento del pericarpio, sería necesario procesar de alguna manera el grano para que pueda ser aprovechado por los animales.

La urea también ha sido utilizada, además de la preservación de los granos de sorgo cosechados con alto contenido de humedad bajo condiciones de aerobiosis, con el objeto de disminuir la concentración de taninos en los mismos. Russell; Lolley (1989) evaluaron la efectividad del tratamiento con distintos niveles de urea (2, 3 y 4% de urea en base a materia seca) en sorgos cosechados con 12% de humedad y reconstituidos a diferentes niveles de humedad (26, 30 y 34%) y almacenados en

aerobiosis. Ellos concluyeron que la tasa de desaparición de los taninos fue de aproximadamente un 68%/día, y que todos los tratamientos fueron efectivos en desactivar los taninos sin hallar diferencias entre el contenido de humedad o entre los niveles de urea (Russell *et al.*, 1989). Romero *et al.* (2001) evaluaron el efecto del contenido de taninos y el agregado de urea en el grano húmedo de sorgo, conservado bajo condiciones de aerobiosis, y demostraron que la urea produjo la hidrólisis del 60% del contenido de los taninos. Por último, Hill *et al.* (1991) hallaron que los granos de sorgos reconstituidos y ensilados, así como los cosechados con alto contenido de humedad, luego de ser tratados con urea y posteriormente almacenados en aerobiosis, presentaron una mayor digestión del almidón que los granos secos y los tratados con ácidos (ácido propiónico y acético) luego de la reconstitución.

El efecto que tiene la urea sobre la inactivación de los taninos también ha sido probado en otras especies vegetales. En hojas frescas de roble (*Quercus incana*) se logró reducir el valor de fenoles totales y taninos condensados en un 55 y 77% el primer día y en un 72 y 89% luego de cinco días de haber agregado la urea respectivamente (Makkar; Singh, 1993). Ben Salem *et al.* (2005a) trabajaron con hojas frescas de otra especie con alto contenido de taninos condensados, como la *Acacia cyanophylla*, y lograron desactivar los taninos aplicándoles una dosis de 2% de urea (base materia seca) y posteriormente almacenándolas en bolsas selladas, simulando condiciones de anaerobiosis.

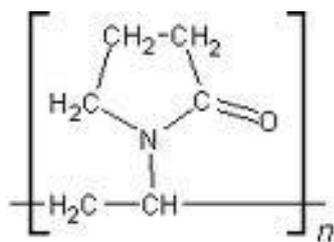
Como se indicó anteriormente, la urea en presencia de agua se hidroliza, amonificando el medio y elevando notablemente el pH (8 – 9) (Russell *et al.*, 1988). Esa alcalinización del medio sería la responsable de la disminución en el contenido de taninos, razón por la cual con otros tratamientos que alcalinizan el medio también se obtienen respuestas similares (Chavan *et al.*, 1979; Price *et al.*, 1979; Waichungo; Holt, 1995). Cuando se exponen los taninos a condiciones de alcalinidad pierden su capacidad de unirse a las proteínas dado que habría una transformación de los taninos en el medio alcalino que conduce a la inactivación de los mismos (Makkar; Becker, 1996). Reichert *et al.* (1980) indican que es posible que al ser sometidos a pH alcalinos los taninos se oxiden y se conviertan en moléculas inertes. La urea desestabilizaría las uniones puente hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas (Nozaki; Tanford, citados por Kumar; Singh, 1984), las cuales participarían en la formación del complejo proteína-tanino. Esto indicaría que el tratamiento con urea puede mejorar la digestión del grano de sorgo, sin embargo se desconoce su comportamiento cuando

dicho grano se conserva luego de un proceso fermentativo bajo condiciones de anaerobiosis.

2.5.3. Tratamiento con polietilenglicol

Los taninos también pueden ser removidos por la adición de adsorbentes tales como el polivinil-pirrolidone (PVP), el polivinil-polipirrolidone (PVPP) o el polietilenglicol (PEG), los cuales se unen a los primeros más fuertemente que las proteínas (Loomis, citado por Kumar; Singh, 1984). Dichos polímeros sintéticos no nutritivos, contienen en sus cadenas suficientes moléculas de oxígeno (Figura 3) que pueden formar fuertes uniones puente hidrógeno con los fenoles y grupos hidroxilos de los taninos (Silanikove *et al.*, 2001). De los tres adsorbentes el más efectivo es el PEG, seguido por PVP y PVPP, siempre comparados a igual concentración en el medio (Makkar *et al.*, 1995a).

$\text{HOCH}_2[-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-]_n\text{CH}_2\text{OH}$ Polietilenglicol (PEG)



Polivinil-polipirrolidone (PVPP)

Figura 3: Polímeros que se unen a taninos

En principio, el PEG se usó para la separación de metabolitos en plantas ricas en taninos (Jones, citado por Ford; Hewitt, 1979a) y luego como marcadores (Landau *et al.*, 2002). En estudios previos (Kay, citado por Jones; Mangan, 1977), se observó que cuando se agregaba PEG al rumen como marcador, se liberaban una gran cantidad de proteína en el licor ruminal. El PEG reaccionaba con el ácido tánico, lo cual lo hacía inadecuado como marcador en animales que consumían forrajes ricos en taninos condensados (Jones; Mangan, 1977). Esos resultados sugirieron que la proteína podía ser liberada del complejo proteína taninos por una reacción con el PEG,

formando complejos insolubles, y de esta manera neutralizando el efecto negativo de los taninos sobre los animales.

El complejo PEG-taninos se forma a través de uniones puente hidrógeno entre las moléculas de oxígeno del PEG y el grupo hidroxilo fenólico de los taninos (Silanikove *et al.*, 1996 a). Esa interacción es irreversible en un amplio rango de pH (Jones; Mangan, 1977), provocando que los taninos no estén disponibles para acomplejarse con las proteínas en el tracto digestivo. Además, estas sustancias tienen la particularidad de poseer una mayor afinidad por los taninos, mayor que la que presentan las proteínas (Makkar, 2003).

Existen PEG de varios pesos moleculares, pero los mismos no reaccionan de la misma maneja en la formación del complejo con los taninos. Comparando PEGs de varios pesos moleculares, Makkar *et al.* (1995a) concluyeron que el incremento del peso desde 2000 a 4000 incrementa la capacidad de unión, pero con pesos moleculares mayores a 4000 no se observaron cambios. Esa fue una a de las razones por la cual se utilizó PEG-4000 en esta tesis.

El PEG, con un peso molecular de 4000 (PEG-4000), uno de los más usados en estudios *in vivo* con rumiantes, es un detergente no-iónico soluble en agua que tiene la capacidad de formar complejos con taninos hidrolizables y condensados en un amplio rango de pH (2-8,5; Jones, citado por Silanikove *et al.*, 1996; Landau *et al.*, 2000). El complejo PEG-taninos es inerte, indigestible y no se metaboliza (Priolo *et al.*, 2000) en ninguna parte del tracto digestivo del animal, razón por la cual se detecta en heces. Además es insoluble en agua en estado de ebullición, en la mayoría de los solventes orgánico, y en soluciones de detergentes neutro y ácido (Silanikove *et al.*, 1996). La efectividad de la ruptura del complejo proteína-taninos ante la presencia de PEG ha sido demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* con ovejas (Jones; Mangan, citados por Kumar; Singh, 1984).

El PEG ha sido utilizado en forma exitosa para cuantificar el efecto negativo y la cantidad de taninos presentes en hojas de plantas a través de las uniones, lo cual puede superar los problemas de extractabilidad de los taninos o de la falta de estandares (Jones *et al.*, 1992; Palmer; McSweeney, 1992; Silanikove *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2000; Silanikove *et al.*, 2001).

La inactivación de los taninos por el PEG incrementa la disponibilidad de los nutrientes y disminuye el efecto de la inhibición microbiana (Makkar, 2003), lo cual repercute en un aumento en la degradabilidad de la materia seca, proteína bruta y fibra en detergente neutro, permitiendo que el animal logre una mejora en la

producción (Ben Salem *et al.*, 2000). La suplementación diaria de PEG a cabras que consumían hojas de árboles con alto contenido de taninos permitió incrementar el consumo y la ganancia de peso, producto de la mejora en la digestión de la materia orgánica, la proteína bruta y la fibra del forraje (Silanikove *et al.*, 1996b).

Varios de los trabajos donde se utilizó el PEG para desactivar taninos se efectuaron sobre hojas de plantas o de arbustos de diferentes especies que poseen altas concentraciones de taninos, y han demostrado un efecto positivo sobre el aprovechamiento de los nutrientes por el animal aumentando la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y del nitrógeno (Palmer; McSweeney, 1992; Getachew *et al.*, 2000; Palmer; Jones, 2000; Ammar *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002). El tratamiento con PEG a hojas de especies arbustivas suministradas a ratas (Horigome *et al.*, 1988), ovejas (Silanikove *et al.*, 1994; Ben Salem *et al.*, 2000; Priolo *et al.*, 2000; Provenza *et al.*, 2000), cabras (Silanikove *et al.*, 1996a; Bhatta *et al.*, 2002) y vacas (Landau *et al.*, 2000) ha incrementado no solo el consumo voluntario, sino también la digestibilidad *in vivo* de la dieta, particularmente de la proteína. Esto último también fue corroborado por una mayor concentración de nitrógeno amoniacal en rumen y de urea en sangre de cabras suplementadas con PEG (Silanikove *et al.*, 1996 b, Bhatta *et al.*, 2002). Por otra parte, la adición de PEG a plantas libres de taninos no incrementó la digestibilidad *in vitro* (McSweeney *et al.*, 1999), la degradabilidad *in situ* (Silanikove *et al.*, 1996c), y la digestibilidad *in vivo* de las mismas (Silanikove *et al.*, 2001). Por esta razón, dichos autores indicaron que el efecto positivo del PEG sobre la degradación de la materia orgánica y de la proteína está relacionado únicamente a la neutralización del efecto adverso de los taninos sobre la degradación ruminal.

La utilización del PEG-4000 para secuestrar taninos en granos de sorgos secos ha sido probado en ratas y pollos a través de la evaluación de la digestibilidad del nitrógeno, la cual se vio aumentada con el agregado de dicha sustancia solo en sorgos con alto contenido de taninos (Ford; Hewitt, 1979 a y b). Sandoval Castro *et al.* (2003) evaluaron el efecto del PEG-4000 en la neutralización de taninos analizando principalmente en hojas de tres arbustos entre los que agregaron también una muestra de grano de sorgo seco, encontrando que la inclusión del PEG aumentó la digestibilidad *in vitro* y la producción de gas de todos los materiales incubados. Evaluando la producción de gas en granos de diferentes híbridos de sorgos tratados con PEG, Cabral Filho *et al.* (2005) hallaron que los granos tratados con PEG incrementaron notablemente la misma. Además, obtuvieron una alta correlación entre el contenido de taninos y el incremento en la producción de gas con el agregado de

PEG, así como también con la digestibilidad aparente de la materia seca (Cabral Filho *et al.*, 2005). Por su parte, Reina *et al.* (2007) indicaron que el aumento en la producción de gas como consecuencia del agregado de PEG puede ser considerada como una medida de la actividad biológica que presentan los taninos cuando están presentes en el grano, y más específicamente, de su capacidad inhibitoria de la fermentación ruminal (Makkar *et al.*, 1995a). Por esa razón, sería importante conocer el efecto del agregado de diferentes dosis de PEG 4000 sobre granos de sorgos almacenados en anaerobiosis con diferentes contenidos de humedad y su comparación con el uso de la urea, sobre la mejora en la degradabilidad *in situ* y la digestión aparente *in vivo* de dietas que contienen alta proporción de granos de sorgo en bovinos, como así también las posibles interacciones entre dichos factores.

2.6 HIPÓTESIS

1. Los granos ensilados con mayor contenido de humedad (cosecha anticipada) bajo condiciones de anaerobiosis presentan una mayor fracción soluble y desaparición *in situ* de la materia seca, proteína bruta y almidón, independientemente del nivel de taninos al momento de la cosecha.
2. El proceso de ensilado del grano disminuye la concentración de taninos en sorgos con alto contenido.
3. Los tratamientos con urea y PEG-4000, en granos ensilados con alto contenido de taninos, aumentan la desaparición *in situ* de la materia seca, proteína bruta y almidón, pero la mejora es superior con agregado de PEG-4000.
4. Existen interacciones entre el contenido de humedad al momento del ensilado y el tratamiento con PEG-4000 o urea sobre la desaparición a nivel ruminal del grano de sorgo.
5. Los granos de sorgo alto en taninos ensilados y tratados con urea y PEG-4000 aumentan la digestión *in vivo* respecto a un grano ensilado y no tratado.
6. Los animales alimentados a corral con el sorgo alto tanino y de endosperma harinoso presentan una mayor ganancia de peso respecto a los alimentados con alto taninos pero de endosperma vítreo. A su vez, los altos en taninos presentan una ganancia de peso menor respecto a los animales alimentados con sorgo blanco.

2.7. OBJETIVOS

1. Determinar si el contenido de humedad (cosecha anticipada) afecta la desaparición *in situ* y su interacción con el contenido de taninos del grano.
2. Evaluar el efecto del contenido de humedad del grano ensilado sobre las características fermentativas (pH y nitrógeno amoniacal) y los parámetros químicos (almidón, proteína bruta, taninos, digestibilidad *in vitro*).
3. Determinar el efecto del proceso de ensilado sobre la modificación de la cantidad de taninos y la desaparición *in situ* del grano.
4. Evaluar el efecto de la utilización a diferentes dosis de PEG-4000 y urea sobre la desaparición *in situ* de granos de sorgo ensilados con diferentes contenidos de humedad.
5. Evaluar el efecto del agregado de urea y PEG-4000 sobre la digestión *in vivo* de granos de sorgo ensilados.
6. Determinar la respuesta productiva de animales alimentados a corral con silaje de grano húmedo de sorgos que difieren en el contenido de taninos y en la textura del endosperma.

3. Capítulo 1:

IMPACTO DE LA HUMEDAD DE COSECHA Y EL PROCESO DE ENSILADO SOBRE EL CONTENIDO DE TANINOS Y LA DESAPARICIÓN *IN SITU* DEL GRANO DE SORGO.

Experimentos 1 y 2.

3.1.- Introducción

La utilización de granos de sorgos enteros no es recomendable por no favorecer el proceso digestivo en los rumiantes debido a que se impide la fijación de las bacterias y posterior ataque enzimático en el compartimiento ruminal (Beachemin *et al.*, 1994, McAllister *et al.*, 1994). Por otra parte, el almidón de los granos de sorgo, es generalmente considerado menos accesible a la degradación enzimática del animal respecto a otros granos (Rooney y Pflugfelder, 1986). Esto se debe a que la matriz proteica donde se encuentran insertos los gránulos de almidón del sorgo es más densa comparada con la de otros granos (McNeill *et al.*, 1975, Rooney y Pflugfelder, 1986). Por esa razón, cualquier mejora en la degradabilidad ruminal de los granos a través del procesamiento, facilitaría el acceso a los gránulos de almidón para el ataque enzimático bacteriano y/o digestivo, aumentando la eficiencia de utilización del grano por parte de los animales.

Varios métodos de procesamiento han sido desarrollados con el objeto de mejorar la digestibilidad y el valor alimenticio del grano de sorgo (Hale, 1973, Hinman y Johnson, 1974, McNeill *et al.*, 1975, Stock y Mader, 1987; Owens *et al.*, 1997), siendo los más estudiados el molido, quebrado, aplastado y ensilado húmedo del mismo. Durante el almacenamiento del grano húmedo bajo condiciones de anaerobiosis, se produce un proceso de fermentación del almidón convirtiéndolo parcialmente en ácido láctico, el cual ayuda a la preservación del grano. Luego del proceso de ensilado, los gránulos de almidón resultan más fácilmente atacados por las enzimas microbianas (Rowe *et al.*, 1999) aumentando notablemente la digestión del mismo (Simpson *et al.*, 1985). El aprovechamiento por parte del animal y las características fermentativas del silaje mejoran cuando los granos de sorgos son cosechados con 14% de humedad, posteriormente reconstituidos con diferentes cantidades de agua y almacenados en condiciones de anaerobiosis (Huck *et al.*, 1999). A medida que aumenta el contenido de humedad con la reconstitución del grano (31,5% vs 23,5 de humedad) se produce

un aumento en la tasa de digestión del almidón (Stock *et al.*, 1987). Esto indicaría que la elección del momento en el cual se cosechan y posteriormente ensilan los granos, sería una herramienta importante a tener en cuenta para mejorar la digestión del grano de sorgo.

Otro aspecto que se puede modificar con el almacenamiento bajo condiciones de anaerobiosis es el contenido de taninos de los granos. La presencia de taninos tiene efectos negativos para el aprovechamiento del grano, entre los que se incluyen la disminución de la digestibilidad de las proteínas (Duodu *et al.*, 2003), y un deterioro de la tasa de crecimiento y la eficiencia de conversión en bovinos (Maxson *et al.*, 1973, Montiel, *et al.*, 2006, Riffel, 2007), y en otros animales como en aves y porcinos (Mitaru *et al.*, 1983, Cousins *et al.*, 1981). Respecto al proceso de ensilado, ha sido demostrado que cuando se ensila la planta entera de sorgo, disminuye la concentración de taninos en todas las fracciones componentes del silaje (Cummins, 1971; Rodríguez *et al.*, 1998). A pesar de ello, la digestibilidad aumentó (Cummins, 1971), o no presentó diferencias ante la desaparición de los taninos (Rodríguez *et al.*, 1998). Si bien, Cummins (1971) demostró que no solo se produce una disminución de la concentración de los taninos en la planta completa, no existen referencias cerca del efecto del ensilado de granos sobre el contenido de taninos de los mismos y la digestibilidad del material obtenido.

Los siguientes experimentos se realizaron con el objeto de determinar el efecto del contenido de humedad (determinado por la cosecha anticipada) al momento del ensilado de dos genotipos de granos de sorgos, con alto (AT) y bajo (BT) en taninos, sobre el contenido de taninos, la desaparición *in situ*, y las características fermentativas y químicas de los silajes (Experimento 1). Además se pretendió evaluar el alcance del proceso fermentativo debido al almacenamiento con humedad en anaerobiosis del grano de sorgo sobre la modificación de la cantidad de taninos y la desaparición a nivel ruminal de un genotipo AT (Experimento 2).

3.2.- Materiales y métodos.

3.2.1- Materiales experimentales e implantación del cultivo.

Los híbridos que constituyeron el material experimental fueron de dos tipos respecto al contenido de taninos: DA49 (híbrido alto en taninos, AT, Dekalb ®) y P84G62 (híbrido bajo en taninos, BT, Pioneer®).

El cultivo fue implantado en un predio de la EEA INTA Balcarce, sobre un suelo Argiudol típico de 1,5 m de profundidad efectiva. La siembra se realizó en forma manual, a 70 cm entre hileras y a una densidad de aproximadamente 6 semillas por metro lineal de surco. Al momento de la siembra se realizó una fertilización con 120 kg ha⁻¹ de fosfato di-amónico y cuando el cultivo tuvo cuatro hojas expandidas se adicionaron manualmente 50 kg ha⁻¹ de urea. Cuando fue necesario se controlaron las malezas en forma manual, y durante todo el ciclo del cultivo se realizaron riegos de manera que las condiciones de humedad no fueran limitantes para el normal desarrollo del mismo.

3.2.2- Confección de los microsilaes

Para el Experimento 1 los granos se cosecharon en tres momentos definidos por el nivel de humedad: 35, 25 y 14%, mientras que en el experimento 2 la humedad de cosecha fue de 35%. La cosecha de los granos se efectuó en forma manual, posteriormente se confeccionaron los microsilaes con los materiales de 35 y 25%. Cuando el grano, que permaneció en el campo en la planta, alcanzó el 14% de humedad se cosecharon tres surcos y con cada uno de ellos se llenaron tres recipientes de PVC, iguales a aquellos donde se confeccionaron los microsilaes. A diferencia de los anteriores, este grano se almacenó en aerobiosis. Para la incubación a nivel ruminal todos los granos fueron molidos a un tamaño de 4 mm.

El proceso de ensilado se realizó en microsilaes experimentales de PVC de 5 litros de capacidad, en los cuales se aseguraron las condiciones de anaerobiosis extrayéndose el aire con una bomba de vacío con una presión de 16 a 20 lb pulg⁻¹. Además, se utilizó un sellador a base de siliconas para asegurar una completa hermeticidad en la tapa. De cada tratamiento se confeccionaron tres microsilaes, y los mismos fueron mantenidos a temperatura ambiente dentro de un galpón hasta el momento de su utilización. Cabe aclarar que para el experimento 2 instantes posteriores a la cosecha se almacenaron tres muestras de grano en los recipientes de PVC a -18°C, con el objeto mantener el grano húmedo sin someterlo al proceso de ensilado.

3.2.3.- Análisis de calidad de los silajes

Al momento de apertura de los microsilajes se tomaron muestras representativas de cada uno de los granos para realizar los siguientes análisis químico-biológicos:

a) materia seca (MS, AOAC, 1995)

b) materia orgánica (MO, AOAC, 1995)

c) almidón (ALM, AOAC, 1995)

d) digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS, usando el sistema de incubación Daisy II (Ankom Technology, Macedon, NY))

e) pH (Baron *et. al.*, 1986)

f) NH₃/N total (Chaney y Marbach, 1962)

g) taninos por el método de Folin-Denis (Magalhães *et al.*, 1997). Cabe aclarar que, debido a que el método de Folin-Denis no determina taninos *per se* (Schofield *et al.*, 2001), el término taninos en esta tesis se refieren a compuesto fenólicos. Esta determinación fue realizada en el Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral.

h) proteína bruta (PB, mediante combustión total de la muestra en atmósfera de oxígeno ultrapuro en un equipo LECO FP528; posteriormente se multiplica el valor obtenido de la combustión (N) por el factor 6,25, Horneck y Miller, 1998).

La determinaciones de pH, NH₃/NT no fueron realizadas sobre los granos cosechados con 14 % de humedad ni sobre los granos que fueron almacenados a -18°C utilizados en el experimento 2.

3.2.4.- Determinación de la desaparición *in situ*

La desaparición ruminal de la materia seca (MS), proteína bruta (PB) y almidón (ALM) de los materiales fue evaluada a través de la técnica *in situ* (Nocek, 1985) mediante el empleo de bolsas de dacrón de 10 x 20 cm, con un tamaño de poro de 53 ± 10 µm (Ankom®).

Se utilizaron tres novillos Aberdeen Angus de 510 ± 13 kg de peso vivo, los cuales poseían una cánula ruminal de 11 cm de diámetro interno. Durante el experimento los animales fueron alojados en corrales individuales (25 m^2) con piso de cemento y libre acceso al agua fresca. Diariamente se higienizaban los corrales para sacar los restos de orina y materia fecal, y se reciclaba completamente el agua de bebida. La dieta que consumieron los animales estuvo compuesta en base a la materia seca por: 48% de heno de alfalfa, 24% de grano de maíz molido, 18% de grano entero de avena, 8,5% de afrechillo de trigo, y 1,5% de urea y sales minerales. La ración fue ofrecida a un nivel de consumo del 1,5% del peso vivo, suministrándose dividida en partes iguales a las 8:00 y 20:00 horas.

Dentro de cada bolsa de dacrón se agregaron $5 \pm 0,05$ g de cada material, con el objeto de obtener una relación entre la cantidad de la muestra y el tamaño de la bolsa de 20 mg/cm^2 (Vanzant *et al.*, 1998). Los tratamientos fueron representados por triplicado y las bolsas se colocaron dentro de mallas de nylon ($30 \times 45 \text{ cm}$, con un tamaño de poro de 4 cm^2) para situarlas en similar posición dentro del rumen y facilitar su posterior localización. Previamente a la introducción dentro del rumen, las bolsas fueron remojadas en agua a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos para simular parcialmente la insalivación (Nocek y English, 1986). Las bolsas fueron colocadas dentro del rumen en diferentes horarios y removidas todas juntas (Nocek, 1988). Los tratamientos fueron incubados durante 16 y 33 horas, lo que correspondería a tiempos de permanencia del material dentro del rumen para tasas de pasaje de la fracción sólida de 6 y 3%/hora, respectivamente. Cabe aclarar que también se pretendió evaluar la fracción soluble, pero debido a los elevados valores que arrojaron, los cuales no son lógicos biológicamente, fueron eliminados estos datos del ensayo.

Durante el período de incubación se caracterizó el ambiente ruminal de los animales a través de la determinación del pH y la concentración de nitrógeno amoniacal. La recolección del fluido ruminal se realizó en forma manual, desde la hora 0 y cada 6 horas luego de iniciado el período de incubación. Dicho fluido fue filtrado con una doble tela de queso, e inmediatamente se determinó el pH de la muestra con un peachímetro digital portátil (Orion, Research Inc., Boston, MA). Una muestra de 4 ml de ese líquido fue acidificada con 4 ml de HCL 0,2N, posteriormente fue centrifugada para determinar en el sobrenadante la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_3) por espectrofotometría (Chaney y Marbach, 1962).

Transcurrido el período de incubación establecido previamente, las bolsas fueron retiradas del rumen e inmediatamente lavadas con agua fría para interrumpir la

degradación bacteriana. Cada bolsa se enjuagó con agua corriente hasta que dicha agua de lavado fuera cristalina, con el objeto de quitar todo el fluido ruminal y las partículas remanentes que hubieran quedado adheridas a la superficie. Posteriormente, las bolsas fueron secadas en estufa a 57 °C durante 48 h hasta obtener un peso constante. El residuo de incubación se pesó y se analizaron los contenidos de ALM (AOAC, 1995) y PB (Horneck y Miller, 1998).

La desaparición ruminal *in situ* (DR) fue expresada como el porcentaje de MS, ALM o PB desaparecido, calculado como:

$$DR (\%) = [(incubado (g) - residuo (g)) / incubado (g)] * 100$$

3.2.5.- Tratamientos y análisis estadísticos

Con el Experimento 1 se evaluó el efecto de tres momentos de cosecha del grano, definidos por los niveles de humedad (35, 25 y 14%), en dos híbridos contrastantes en el contenido de taninos sobre la desaparición *in situ* de la MS, PB y ALM. Los tratamientos quedaron integrados por la combinación de 4 factores: tres niveles de humedad al momento de la cosecha (35, 25 y 14%), dos niveles de humedad de incubación del grano (material seco artificialmente: 0 %, y húmedos), dos tipos de granos que se diferencian en el nivel de taninos (alto: AT y bajo: BT) y dos tiempos de incubación (16 y 33 h de permanencia en rumen). El factor humedad de incubación se introduce para determinar si el efecto de la cosecha anticipada ocasiona una estructura diferente del grano y modificaciones durante el ensilado, o se debe a la presencia de agua *per se* en el grano. Cabe aclarar que los granos fueron secados en estufa a 57 °C durante 48 horas hasta peso constante.

El análisis estadístico de la desaparición *in situ* de la MS, PB y el ALM se realizó mediante un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con un arreglo factorial, utilizando el animal como factor de bloqueo y de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{hijklm} = \mu + H_h + P_i + I_j + T_k + (HP)_{hi} + (HT)_{hk} + (HI)_{hj} + (PI)_{ij} + (PT)_{ik} + (IT)_{jk} + (HPI)_{hij} + (HPT)_{hik} + (HIT)_{hjk} + (PIT)_{ijk} + (HPIT)_{hijk} + A_l + \epsilon_{hijklm},$$

donde:

Y_{hijklm} : variable observada,

μ : media general,

H_h : efecto de la h-ésima humedad de cosecha,

P_i : efecto del i -ésimo tipo de grano,
 I_j : efecto de la j -ésima humedad de incubación (materiales secados artificialmente y húmedos),
 T_k : efecto del k -ésimo tiempo de incubación,
 $(HP)_{hi}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y el tipo de grano;
 $(HT)_{hk}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y el tiempo de incubación,
 $(HI)_{hj}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y la humedad de incubación,
 $(PI)_{ij}$: efecto de la interacción entre el tipo de grano y la humedad de incubación anidad en la humedad de cosecha,
 $(PT)_{ik}$: efecto de la interacción entre el tipo de grano y el tiempo de incubación,
 $(IT)_{jk}$: efecto de la interacción entre la humedad de incubación y el tiempo de incubación,
 $(HPI)_{hij}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, el tipo de grano y la humedad de incubación,
 $(HPT)_{hik}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, el tipo de grano y el tiempo de incubación,
 $(HIT)_{hjk}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, la humedad de incubación y el tiempo de incubación,
 $(PIT)_{ijk}$: efecto de la interacción entre el tipo de grano, la humedad de incubación y el tiempo de incubación,
 $(HPIT)_{hijk}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, el tipo de grano, la humedad de incubación y el tiempo de incubación,
 A_l : efecto del l -ésimo bloque (animal),
 ε_{ijklm} : error experimental.

Los parámetros de calidad (DIVMS, PB, taninos, MO y ALM) se analizaron bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA) con un arreglo factorial por la combinación de tres humedades de cosecha y dos tipos de granos. El modelo matemático empleado respondió a la siguiente ecuación:

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + P_j + (HP)_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

donde:

Y_{ijk} : variable observada,

μ : media general,

H_i : efecto de la i-ésima humedad de cosecha,

P_j : efecto del j-ésimo tipo de grano,

$(HP)_{ij}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y el nivel de taninos,

ε_{ijk} : error experimental.

El pH de los silajes y las concentraciones de N-NH₃/NT fueron analizados bajo el mismo modelo pero solo para los niveles de humedades de cosecha de 35 y 25%.

Con el desarrollo del Experimento 2 se evaluó el efecto del proceso de ensilado sobre el contenido de taninos y la desaparición ruminal *in situ* de un grano cosechado con alto contenido de humedad (35%). Los tratamientos evaluados fueron conformados de acuerdo al tipo de almacenamiento: grano sometido al proceso de ensilado luego de la cosecha (ensilado) y grano almacenado a -18°C luego de la cosecha (no ensilado). Este último grano fue almacenado a -18°C para poder mantenerlo con alto contenido de humedad (35%) sin que sufra algún proceso de deterioro o putrefacción hasta el momento de la incubación.

En ambos experimentos, cuando alguna de las interacciones resultó significativa, se fijó uno de los factores y la misma fue analizada con la macro GLIMMIX de SAS (2009).

La desaparición *in situ* de la MS, PB y ALM se analizó con un DBCA utilizando el animal como factor de bloqueo y según el siguiente modelo:

$$Y_{hijk} = \mu + E_h + T_i + A_i + \varepsilon_{hijk},$$

dónde:

Y_{hijk} : variable observada,

μ : media general,

E_h : efecto del h-ésimo tipo de almacenamiento,

T_i : efecto de la i-ésimo tiempo de incubación,

$(ET)_{hi}$: efecto de la interacción entre el tipo de almacenamiento y el tiempo de incubación,

A_j : efecto del j-ésimo animal,
 ε_{hijk} : error experimental.

La calidad de los granos ensilados y no ensilados (DIVMS, PB, taninos, MO y ALM) se evaluaron con un DCA bajo el siguiente modelo:

$$Y_{hi} = \mu + E_h + \varepsilon_{hi},$$

donde:

Y_{hi} : variable observada,
 μ : media general,
 E_h : efecto del i-ésimo tipo de almacenamiento,
 ε_{hi} : error experimental.

En los dos experimentos los análisis se realizaron con el procedimiento GLM (General Linear Models) de SAS (2009) y las medias se compararon con el test de Tukey-Kramer. Se consideraron diferencias entre tratamientos estadísticamente significativas, y no significativas cuando la probabilidad del error fue menor o mayor al 5%, respectivamente.

3.3.- Resultados y discusión.

3.3.1.- Experimento 1

Los parámetros químicos y la DIVMS de los granos utilizados en el Experimento 1 se presentan en la Tabla 1. La interacción entre la humedad al momento de la cosecha y el tipo de grano (AT y BT) no fue significativa ($P > 0,05$) para la DIVMS y los porcentajes de ALM, PB y MO, razón por la cual en la Tabla 1 se presentan los valores promedios para ambos híbridos de sorgos.

La humedad de cosecha tuvo efecto sobre la DIVMS ($P < 0,05$), aumentándola a medida que los granos se cosecharon con más humedad (Tabla 1). Los porcentajes de ALM, PB y MO de los granos no fueron afectados por la humedad de cosecha y el tipo de grano ($P > 0,05$), siendo los valores promedios de 70,1, 8,8 y 97,5% para dichos parámetros respectivamente (Tabla 1). El hecho que no hayan sido diferentes los porcentajes de almidón y proteína bruta entre las diferentes humedades de cosecha, indicaría que los granos que se cosecharon con la mayor humedad (35%) ya habían

alcanzado la madurez de fisiológica, momento en el cual se interrumpe el transporte de sustancias de la planta hacia el grano habiéndose producido la máxima acumulación de materia seca en el mismo (Vanderlip; Reeves, 1972).

Tabla 1: Efectos de las humedades de cosecha sobre los parámetros químicos y fermentativos de los granos

Humedad de cosecha (%)	DIVMS (%) ¹	ALM (%) ¹	PB (%) ¹	MO (%) ¹	pH ¹	N-NH ₃ /NT (%) ¹
35	74,4 a	68,7 a	9,11 a	97,2 a	4,16	4,38 a
25	67,6 b	70,0 a	9,07 a	97,1 a	4,20	2,37 b
14	61,9 c	71,6 a	8,43 a	98,1 a	-----	-----
Valor P	0,0003	0,27	0,09	0,17	0,31	0,03
EEM	1,28	1,20	0,35	0,39	0,28	0,34

¹: Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05, Test Tukey-Kramer). E.E.M.: error estándar de la media

Respecto a los parámetros fermentativos de los silajes, el pH de los mismos no fue afectado por la humedad de cosecha (Tabla 1), ni por el tipo de grano, alcanzando un valor promedio de 4,18 (4,44 y 3,93 para sorgos AT y BT, respectivamente). Riffel (2007) tampoco halló diferencias en los pH de granos húmedos de sorgos alto y bajo en taninos ensilados, siendo los valores obtenidos de 4,27 y 4,28 respectivamente.

En cambio, el N-NH₃/NT fue modificado la humedad de cosecha (Tabla 1) y por los niveles de taninos del grano (AT vs BT) de manera independiente, debido a que la interacción nivel de taninos x humedad de cosecha tampoco fue significativa (P>0,05).

En cuanto al efecto de la humedad de cosecha, a medida que aumentó la misma, se produjo un incremento (P<0,05) en el % N-NH₃/NT de los silajes, siendo los valores alcanzados de 4,38 y 2,37 % para las humedades de 35 y 25% respectivamente. Esto fue coincidente con lo indicado por Baron *et al.* (1986) quienes hallaron que a medida que el nivel de humedad del silaje se incrementa, aumenta la tasa y extensión de fermentación y proteólisis en el grano ensilado.

Respecto al tipo de grano, el silaje BT presentó un porcentaje mayor de N-NH₃/NT (P<0,05, 4,49%) respecto al silaje AT (2,40%), debido a que la presencia de taninos pudo haber protegido la proteína potencialmente degradable por las bacterias durante el proceso de ensilado. Eso fue similar a lo hallado por Gonçalves *et al.* (1999) y Albrecht; Muck (1991), quienes indicaron que la reducción del N-NH₃ es una consecuencia de la menor disponibilidad de la PB debido a la formación del complejo

proteína-tanino y a la inhibición de las enzimas proteolíticas de la planta y/o las bacterianas.

El tipo de grano tuvo efecto sobre la DIVMS ($P < 0,05$), siendo independiente de la humedad con la que se cosechó el grano (interacción humedad de cosecha x tipo de grano no significativa, $P > 0,05$). El genotipo BT (P84G62) presentó una mayor DIVMS respecto al AT (DA 49), siendo las digestibilidades promedios de 73,8 y 62,1% respectivamente. Esto ha sido coincidente con varios trabajos donde se indica el efecto de negativo de la presencia de taninos en el grano sobre la digestibilidad *in vitro* del mismo (Saba *et al.*, 1972, Schaffert *et al.*, 1974, Hibberd *et al.*, 1982a, Hibberd *et al.*, 1985, Streeter *et al.*, 1990 a).

La concentración de taninos en el grano estuvo influenciado por la humedad de cosecha y el tipo de grano en forma conjunta, dado que la interacción entre dichos factores fue significativa ($P < 0,0001$, Tabla 2). En el tratamiento BT no se hallaron diferencias en la concentración de taninos entre los diferentes momentos de cosechas pero en el tratamiento AT las concentraciones de taninos en los granos ensilados (35 y 25%) fueron inferiores ($P < 0,05$) a la del grano seco (14%).

Tabla 2: Concentración de taninos en genotipos alto (AT) y bajo (BT) en diferentes momentos de cosechas.

Humedad de cosecha (%)	AT ¹	BT ¹
35	138,6 a	56,3 a
25	132,4 a	57,8 a
14	375,0 b	69,6 a
Valor P	0,0001	0,85
EEM	11,2	8,21

¹: mg eq. de ácido tánico/100 g de muestra, base materia seca (Método de Folin Denis). Promedios con distintas letras difieren significativamente ($p < 0.05$, Test Tukey-Kramer). E.E.M.: error estándar de la media.

El menor contenido de taninos de los granos AT cosechados y ensilados con alta humedad (35 y 25%, Tabla 2) posiblemente se deba a cambios o destrucción de los taninos ante las condiciones de anaerobiosis. Mitaru *et al.* (1984a) reconstituyeron con diferentes niveles de humedad tres híbridos de sorgos con altos contenidos de taninos y los almacenaron bajo condiciones de anaerobiosis con el objeto de evaluar el efecto del almacenamiento sobre tasa de desactivación de dichas sustancias. Los

autores hallaron que la extractabilidad de los taninos en metanol disminuyó significativamente a medida que transcurrían los días; la disminución de la extractabilidad se considera como un indicador del aumento en la tasa de desactivación los mismos. Las mayores digestibilidades *in vitro* de los granos AT ensilados respecto al grano sin ensilar (68,8, 62,5 y 55,1%, para 35, 25 y 14% de humedad respectivamente) fue una respuesta a la disminución en el contenido de taninos obtenida.

Los niveles de taninos del sorgo BT no fueron modificados por la humedad de cosecha y estuvieron muy por debajo del genotipo AT (Tabla 2). El proceso de ensilado no tuvo efectos sobre la concentración de los taninos, ya que no se hallaron diferencias ($P>0,05$) entre los momentos de cosecha (14% vs. 25 y 35% de humedad) y estuvieron muy por debajo del genotipo AT. Cummins (1971) cosechó plantas enteras de un genotipo bajo en taninos, una sub-muestra fue ensilada y la otra secada a 70 °C (no ensilada). Dicho autor no halló ninguna modificación en el contenido de taninos sobre la fracción granos de ese genotipo. Mitaru *et al.* (1983) y Teeter *et al.* (1986) reconstituyeron granos de sorgo con alto y bajo contenido de taninos y no hallaron efectos, por el agregado de agua y posterior almacenamiento en anaerobiosis, sobre el contenido de taninos extractables en los genotipos con bajo contenido de taninos.

El método Folin-Denis para determinar taninos, es un método colorimétrico que cuantifica los grupos fenólicos totales, y se basa en reacciones de óxido reducción entre los compuestos fenólicos e iones metálicos (Schofield *et al.*, 2001). Si bien este protocolo no discrimina taninos condensados de otros compuestos fenólicos (ácidos fenólicos o flavonoides), puede ser usado en sorgo ya que este grano posee en su composición química solo pequeñas cantidades de otros compuestos fenólicos que no son taninos (Hahn *et al.*, 1984, Magalhães *et al.*, 1997). Dichos compuestos pueden dar reacciones positivas con los reactivos (mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico o reactivo de Folin Denis) a pesar de no ser taninos. Posiblemente la mayoría de los polifenoles hallados en el grano BT no sean taninos, y estos últimos se hallen en muy baja concentración. Esto último ocasionaría que no se alcance a detectar la posible modificación, si ocurriera, en la cantidad de taninos condensados luego de ser sometidos al proceso de ensilado.

La desaparición *in situ* de los sorgos evaluados en el Experimento 1 estuvo influenciada por el tiempo de incubación del material en el rumen ($P<0,05$), pero no interaccionó ($P>0,05$) con ninguno de los otros factores, por esa razón los valores que

se presentan a continuación son el promedio de los dos tiempos de incubación. Como era de esperar, el material que permaneció más tiempo en el rumen fue el que más se degradó, siendo los porcentajes de desaparición promedio de la MS de 43,1 y 59,5% para las 16 y 33 horas de permanencia en rumen, respectivamente. El pH y la concentración de nitrógeno amoniacal promedio en el líquido ruminal fueron de $6,23 \pm 0,13$ y $27,9 \pm 9,1$ mg/dl, indicando que fue óptimo el ambiente ruminal bajo el cual se desarrollaron las incubaciones.

El nivel de taninos y la humedad de cosecha, influyeron ($P < 0,05$) sobre la desaparición *in situ* de los granos. Dichos efectos fueron independientes, debido a que las interacciones entre los mismos y con los otros factores no fueron significativas ($P > 0,05$). En la figura 4 se muestra la disminución de la desaparición ruminal de la materia seca (MS), proteína bruta (PB) y almidón (ALM) a debida a la presencia de taninos en los granos de los dos genotipos evaluados. Comparando el genotipo AT vs BT, el primero tuvo un 34, 40 y 25% menos de desaparición respecto al BT en la fracciones MS, PB y ALM, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores mediante la aplicación de técnica de evaluación *in vitro* (Schaffert *et al.*, 1974, Streeter *et al.*, 1990 a, Riffel, 2007) en *in situ* (Montiel, 2003). Schaffert *et al.* (1974) incubaron genotipos de sorgos con alto y bajo contenido de taninos durante 48 horas y encontraron una desaparición de la materia seca del 46,4 y 72,5%, respectivamente. Diferencias promedio de 13, 38 y 24,5% han sido halladas en las degradabilidades *in situ* de la materia seca, proteína bruta y almidón respectivamente entre sorgos bajos y altos en taninos (Montiel, 2003). Evaluando la correlación entre características químicas del grano y la desaparición *in situ*, Montiel *et al.* (2011) hallaron que el 72% de la variación en la desaparición de los granos de diferentes híbridos estuvo atribuida al contenido de taninos. Harris *et al.* (1970) y O'Brian (1999) hallaron altas correlaciones negativas entre la concentración de taninos y la digestión *in vitro* ($r = -0,90$ y $-0,92$ respectivamente). Si bien, en el presente ensayo se utilizaron solo dos híbridos, ante los antecedentes indicados anteriormente, se podría inferir que las diferencias en desaparición entre los dos tipos evaluados se deban en gran medida al contenido de taninos y no a otros factores.

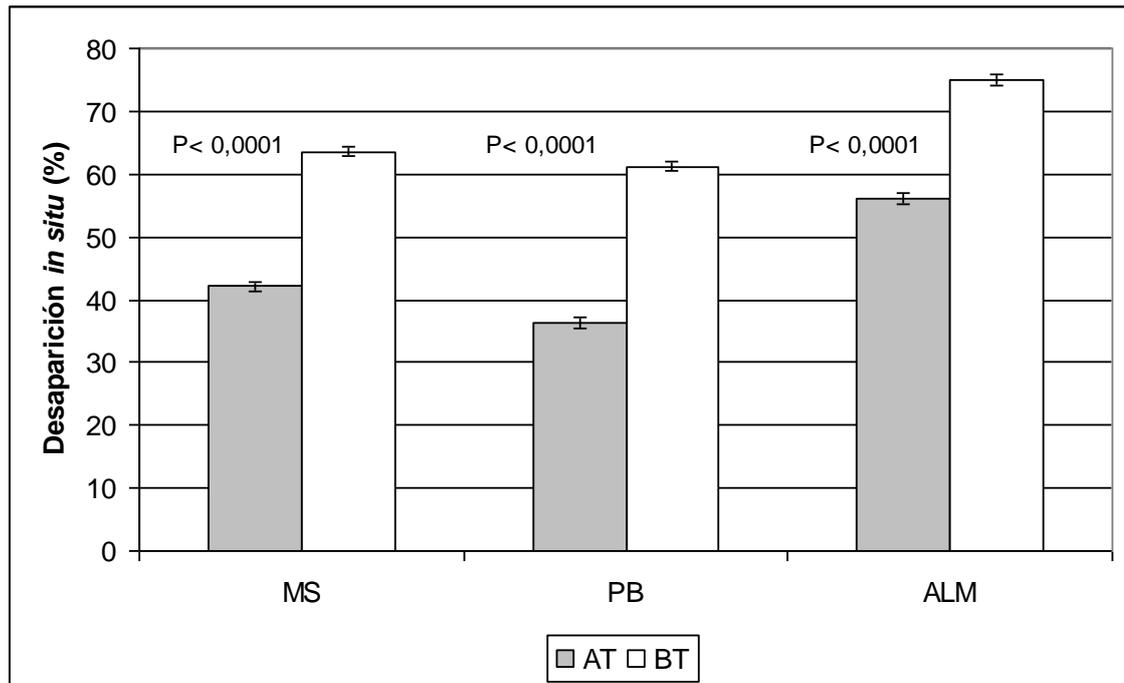


Figura 4: Desaparición *in situ* de silajes de granos de sorgos con alto (AT) y bajo (BT) contenido de taninos (promedio de las tres humedades de cosecha).

En la figura 5 se muestra la disminución de la desaparición ruminal de la materia seca (MS), proteína bruta (PB) y almidón (ALM) a medida que disminuye la humedad de cosecha. Las máximas desapariciones se alcanzaron cuando los granos fueron cosechados y ensilados con 35% de humedad.

Una vez que se alcanza la madurez fisiológica, a medida que se adelanta el momento de cosecha, se obtiene un grano con mayor contenido de humedad, que debe ser ensilado o bien secado artificialmente para que no se deteriore y pierda calidad. El ensilado del grano húmedo incrementa la degradabilidad de la materia seca y del almidón (Galyean *et al.*, 1981, Baron *et al.*, 1986), aunque no está bien cuantificado cuanto se debe al efecto de la humedad y cuanto al proceso de ensilado en sí (Baron *et al.*, 1986).

Las mejoras halladas en términos de degradabilidad a favor del grano húmedo de sorgo (35 y 25%) respecto al procesado seco (14% de humedad y molido), parecen estar asociadas con alteraciones en la estructura. En relación a esto, Ware *et al.* (1977) reportaron que durante el proceso de ensilado del grano ocurren cambios referidos a un aumento en las fracciones de proteína y carbohidratos solubles, lo que provoca un aumento en la disponibilidad de nitrógeno y energía para los microorganismos ruminales. Por su parte, Hale (1973), indica que la ruptura de la

matriz proteica alrededor de los gránulos de almidón es indispensable para mejorar la digestión del mismo.

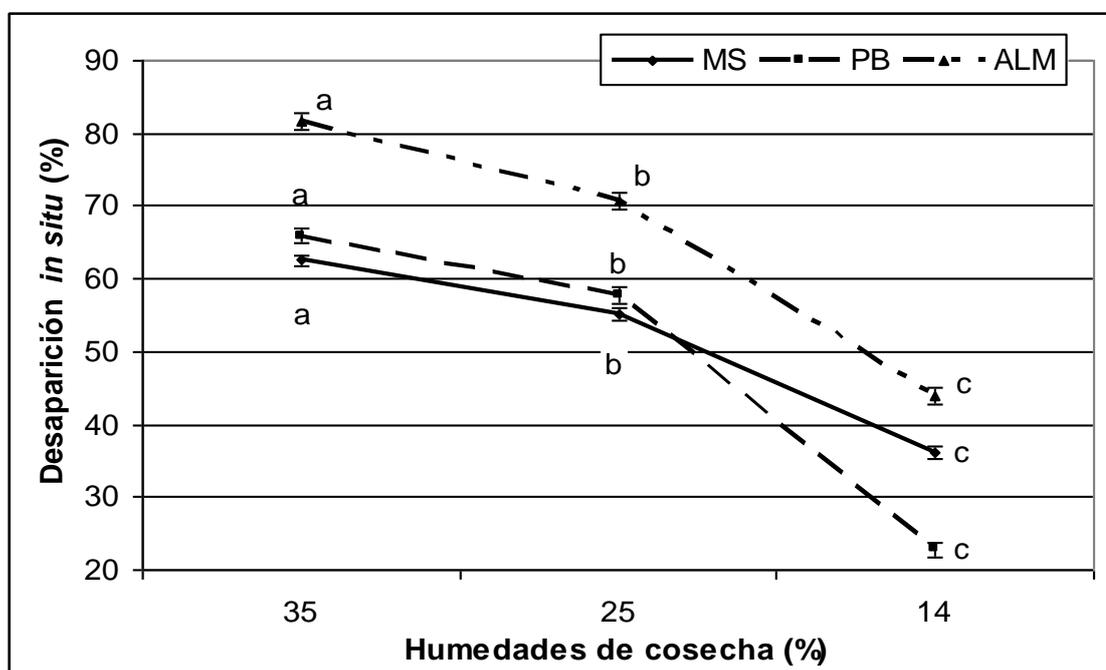


Figura 5: Desaparición *in situ* de silajes de granos de sorgo cosechados y ensilados con diferentes humedades (promedio del ambos híbridos, AT y BT). Letras diferentes dentro de una misma fracción (MS, PB, ALM) indican diferencias estadísticamente significativas entre las humedades de cosecha ($p < 0,05$, Tukey-Kramer).

Sullins *et al.* (1971) concluyeron que durante la reconstitución del grano ocurren una serie de procesos que llegan a la interrupción de la continuidad de la matriz proteica, causando una liberación de gránulos de almidón y cuerpos proteicos. Además, la modificación en la estructura del endosperma periférico durante la reconstitución del grano de sorgo tiene un alto impacto, ya que es un área extremadamente dura y que no se rompe con el molido (Sullins *et al.*, 1971). McNeill *et al.* (1975) indicó que el principal factor que afecta la eficiencia de utilización del almidón en el grano de sorgo es el cambio sobre la solubilidad o integridad de la matriz proteica que encapsula los gránulos de almidón, dado por el efecto que produce el procesamiento. A través del microscopio electrónico de barrido se pueden observar que el molido de los granos secos expone el interior de las células del endosperma al ataque enzimático, pero los gránulos de almidón permanecen embebidos dentro de la matriz proteica (Sullins y Rooney, 1971; McAllister *et al.*, 1993). Posiblemente, en el grano de sorgo cosechado con alto contenido de humedad, la matriz proteica que rodea los gránulos de almidón sea discontinua y no tan densa, lo cual permite una

mayor penetración de las bacterias ruminales. Esto explicaría la mejora en la DIVMS y la desaparición *in situ* hallada en los granos ensilados (35 y 25%) vs. el grano seco (14%) (Tabla 2 y gráfico 1). Además, otro motivo de la mejora en la desaparición *in situ* de los AT granos ensilados es la diferencia en el contenido de taninos que se hallaron respecto al grano sin ensilar (14% de humedad), siendo dicha diferencia en promedio del 63,8% (Tabla 2).

La humedad con que se cosecha y ensila el grano también tiene influencia sobre la desaparición a nivel ruminal de la MS, PB y ALM (35 vs. 25%, Figura 2). La cantidad de nitrógeno soluble (como porcentaje del nitrógeno total) se incrementa durante el proceso de ensilado, y este hecho cobra mayor importancia a medida que aumenta la humedad del grano debido a que se incrementa el proceso de proteólisis (Baron *et al.*, 1986). Los sorgos ensilados con 35% de humedad produjeron un 39% más de $N-NH_3/NT$ respecto a los ensilados con 25 % de humedad, lo cual demuestra una mayor proteólisis en los primeros. Esto ocasionaría una disminución en la aptitud de protección de la matriz proteica, y por lo tanto un incremento en la degradabilidad del almidón en los granos cosechados con 35% de humedad (Figura 2). Similar tendencia se presentó sobre la DIVMS de los silajes (Cuadro 1). Estos datos fueron coincidentes con los informados por Neuhaus y Totusek (1971) quienes evaluaron los efectos de las humedades de cosecha en interacción con la temperatura de almacenamiento, y hallaron las mejores digestibilidades *in vitro* en los granos cosechados con 35% de humedad.

Cuando se analizó el efecto de la humedad de incubación, la misma no presentó interacción con ninguno de los factores analizados. La humedad de incubación no influyó ($P>0,05$) sobre la desaparición del grano ya que no se hallaron diferencias entre el grano húmedo y el secado artificialmente (Figura 6).

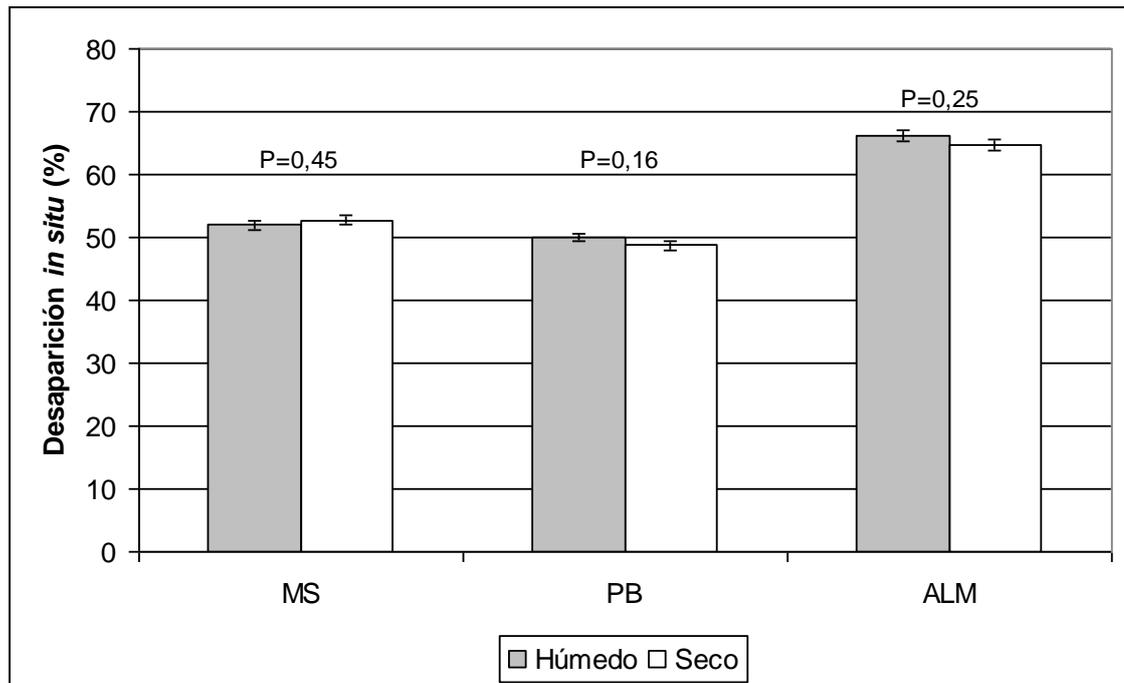


Figura 6: Desaparición *in situ* de silajes de granos de sorgos húmedos o secados artificialmente (seco).

Estos resultados indican que la degradabilidad no estaría afectada por el contenido de agua *per se*, sino por el estado de madurez del grano que pasa desde la madurez fisiológica a la de cosecha. La mejora en la digestión se debería a que cuando el grano se cosecha temprano la matriz proteica no se encontraría completamente formada y solidificada (Sullins *et al.*, 1971, Hale, 1973) como sucedería con el grano que alcanzó la humedad de cosecha (14%). La discontinuidad en la matriz proteica permite que los gránulos de almidón puedan ser separados de la misma y de las paredes celulares durante el molido o la masticación. Estos resultados fueron coincidentes con lo hallado por Neuhaus y Totusek (1971) sobre granos de sorgo reconstituidos. Dichos autores hallaron que secar el grano luego de la reconstitución no tiene ningún efecto sobre la mejora en la digestibilidad ganada previamente por la reconstitución. En el grano de maíz, Parra (2004), obtuvo similares curvas de producción de gas *in vitro* en materiales incubados tal cual (con las humedades de cosecha correspondientes, 20, 26 y 32%) y esos mismos materiales secados artificialmente. Además, la humedad de cosecha podría influir sobre la degradabilidad probablemente a través de los cambios que se generan durante el proceso de ensilado. Durante dicho proceso se produce una solubilización parcial de la matriz proteica a causa de la proteólisis que se produce en el mismo (Philippeau y

Michalet-Doreau, 1998), dejando de esta manera más expuestos los gránulos de almidón.

3.3.2.- Experimento 2

En la Tabla 3 se muestran los parámetros químicos y fermentativos de los granos del genotipo AT correspondientes al Experimento 2 que fueron sometidos o no al proceso de ensilado.

Tabla 3: Parámetros químicos y fermentativos del grano alto tanino ensilado y no ensilado.

	DIVMS (%)	Taninos ¹	PB (%)	ALM (%)	MO (%)	N-NH ₃ /NT (%)	pH
Ensilado	69,8	155,6	8,03	68,2	96,0	2,72	4,47
No ensilado	44,0	368,2	7,6	64,8	96,8	--	--
Valor P	0,0014	<0,0001	0,3129	0,4448	0,3440		
E.E.M.	1,95	4,76	0,26	2,92	0,53		

¹: mg eq. de ácido tánico/100 g de muestra, base materia seca (Método de Folin Denis). E.E.M.: error estándar de la media.

Los granos que fueron ensilados presentaron un significativo aumento en la DIVMS la cual fue 25,8 unidades porcentuales mayores, pero no se modificaron los porcentajes de PB, ALM y MO (Tabla 4). Esto estuvo acompañado por una notable disminución en la cantidad de taninos extractables, la cual se redujo en aproximadamente un 58% con el proceso de ensilado (Tabla 3). Los niveles de taninos condensados decrecieron luego del proceso fermentativo, y dicha tendencia también fueron observada por varios autores (Cummins, 1971; Mitaru *et al.*, 1984 a y b; Osman, 2004). Dichos autores observaron una disminución en la concentración de taninos con mejoras en la calidad nutricional de los granos. Cummins (1971) observo reducciones mayores al 50% en las concentraciones de taninos, similares a la hallada en este trabajo, y aumentos de un 30% en los coeficientes de digestibilidad *in vitro* de la materia seca de la fracción grano de los silajes comparado con el tratamiento sin ensilar. Myer *et al.* (1986) hallaron que el almacenamiento con alta humedad (24 y 26%) redujo el contenido de taninos analizables en un 27 a 30% y aumento la digestibilidad de la PB en cerdos. Por su parte, Osman (2004) observó una reducción de los taninos entre un 15 a 30% en la concentración de los taninos en granos de

sorgo luego de la fermentación. Gonçalves *et al.* (citados por Rodríguez *et al.*, 1999) obtuvieron con el ensilado una significativa disminución en el contenido de taninos en cuatro híbridos de sorgo, la cual fue más acentuada en los sorgos con mayor contenido.

La desaparición *in situ* de todas las fracciones estuvo influenciada por el tiempo de incubación en rumen, pero no interaccionó con el tipo de almacenamiento ($P>0,05$). Como era de esperar, los granos que permanecieron 33 horas en el rumen tuvieron una mayor desaparición de la MS, PB y ALM respecto a aquellos que solo estuvieron 16 hs ($P<0,05$).

El proceso de ensilado también tuvo un efecto positivo sobre la desaparición *in situ* de la MS, PB y ALM del silaje de grano húmedo alto tanino respecto al grano almacenado sin ensilar (Figura 7).

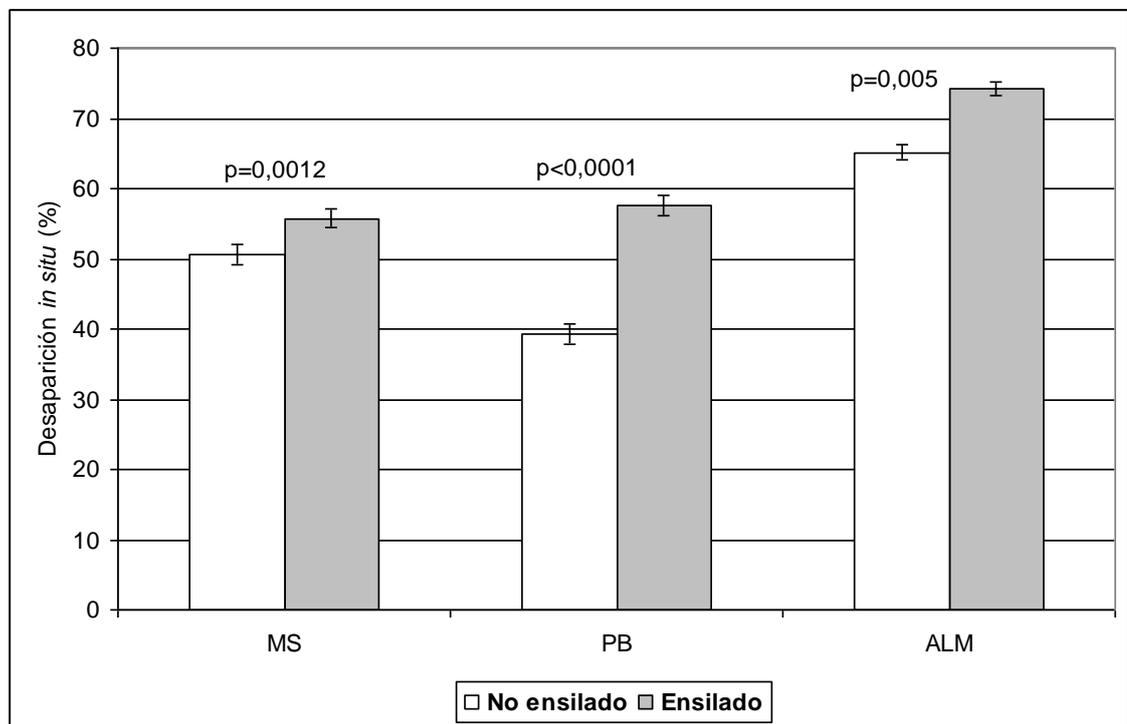


Figura 7: Desaparición *in situ* de granos de un genotipo alto tanino ensilado y no ensilado.

Las comparaciones se realizaron dentro de una misma fracción (MS, PB y ALM, Test de Tukey-Kramer).

La fracción proteica del grano fue la más favorecida en el aumento en la desaparición *in situ* luego del proceso de ensilado del grano, incrementándose la misma en un 47% respecto al grano no ensilado. Esto indica el fuerte efecto negativo

que ejercen los taninos al unirse a la proteínas, formando los complejos proteína-tanino resistentes al ataque bacteriano lo cual provoca una disminución de la degradabilidad ruminal (Herrera-Saldana *et al.*, 1990, Duodu *et al.*, 2003, Montiel, 2003). La desaparición *in situ* de la MS y el ALM aumentaron luego del proceso fermentativo en un 10 y 15% respectivamente (Figura 7).

El aumento en la desaparición ruminal del grano luego de ser sometido a un proceso fermentativo está relacionado con la disminución en el contenido de taninos. Dicha reducción puede deberse a una inactivación de los taninos debido al bajo pH y a las condiciones de anaerobiosis usualmente presentes en los silajes (McSweeney *et al.*, 1999). A pesar de que varios autores concuerdan sobre el efecto positivo de la fermentación, producto del almacenamiento con humedad en anaerobiosis, logrado con el ensilado de la planta entera (Cummins, 1971, Rodriguez *et al.*, 1999, Oliveira *et al.*, 2009) o reconstituyendo el grano (Reichert *et al.*, 1980, Mitaru *et al.*, 1984 a, b), aún no son claros cuales son los mecanismos por los cuales se produce la reducción del nivel de taninos.

La desactivación de los taninos durante el ensilado del grano probablemente se deba a que los mismos se polimericen a mayores oligómeros los cuales son insolubles en metanol, o a que dichas sustancias se unan a las proteínas o a otros constituyentes del grano disminuyendo de esa manera su extractabilidad (Mitaru *et al.*, 1984a). En esta tesis el almacenamiento anaeróbico aumentó la desaparición de la fracción proteica y almidonosa del grano (Figura 3), por lo cual es improbable que los taninos se hayan unido a las proteínas u otros constituyentes del grano durante el almacenamiento. La mayoría de la publicaciones apoyan la teoría que indican Reichert *et al.* (1980), quienes propusieron que el mecanismo que ocurriría, durante el almacenamiento anaeróbico y bajo condiciones de acidez, es la polimerización de los taninos a oligómeros mayores los cuales se vuelven insolubles y pierden su habilidad para unirse a las proteínas. Dicho mecanismo sería similar a las reacciones de polimerización natural que tienen lugar en el grano mientras se va desarrollando y a medida que se aproxima la madurez fisiológica (Price *et al.*, 1979, Davis y Hosenev, 1979b; Reichert *et al.*, 1980). Esto explicaría la menor cantidad de taninos que se extraen luego de ser ensilados los granos (Tabla 3) y la mejora en la DIVMS (Tabla 3) y la desaparición ruminal (Figura 7). La capacidad de los taninos de unirse a las proteínas se incrementa con el tamaño del polímero del tanino y alcanza el máximo cuando el polímero está compuesto por entre 3 a 10 monómeros (Butler *et al.*, 1984; Goldstein y Swain, 1963, citados por Mitaru *et al.*, 1984 a). Los taninos altamente

polimerizados (> a 10 monómeros de flavan) podrían ser insolubles y tener pocos sitios reactivos, o ser tan largos que no alcanzaría a ensamblar en la orientación de la proteína y formar las uniones (Joslyn y Goldsterin, 1964, citados por Mitaru *et al.*, 1984 a).

El efecto positivo de la anaerobiosis sobre la disminución en los taninos ha sido observado también en hojas de roble (Makkar y Singh, 1993). Dichos autores almacenaron en un ambiente anaeróbico las hojas de roble y observaron que, a medida que transcurrían los días, los polifenoles totales y los taninos condensados fueron disminuyendo, y aumentó aproximadamente dos veces el grado relativo de polimerización de los mismos. Esto indica que los taninos condensados de hojas de roble se polimerizaron a mayores oligómeros (Makkar y Singh, 1993) de manera similar a lo indicando para los taninos del sorgo. Por su parte, Ben Salem *et al.* 2005a, proponen que el ensilado de especies de arbustos con taninos sería una buena técnica para mejorar su valor nutritivo.

Por otro lado, hay autores que infieren que la reducción en el nivel de taninos probablemente se deba a la degradación de los taninos a polifenoles de bajo peso molecular producto de la actividad microbiana durante la fermentación (Kondo *et al.*, 2004). Cabe aclarar que dichos autores trabajaron con taninos presentes en hojas de té verde. Por su parte, Oliveira *et al.* (2009) proponen esta teoría para explicar la disminución en el contenido de taninos que obtuvieron ensilando plantas enteras de un genotipo de sorgo alto en taninos.

Lo anteriormente citado indica que aún no son claros cuales son los cambios en la estructura y la reactividad de los taninos que provocan una disminución en la cantidad de taninos extractables luego de un proceso fermentativo. Si bien los trabajos citados coinciden en la evaluación de taninos del tipo condensados, posiblemente no sea constante el patrón de comportamiento de los taninos cuando proceden de diferentes especies. Por esa razón, dichos cambios deberían ser más profundamente estudiados.

3.4.- Conclusiones

La cosecha anticipada y el posterior ensilado del grano de sorgo fue un método efectivo para aumentar la digestibilidad *in vitro* y la desaparición *in situ* de la MS, la PB y el ALM. Dichas respuestas estuvieron influenciadas por la humedad de cosecha, obteniéndose respuestas positivas en ambos granos ante el aumento de la humedad

de manera similar en los genotipos alto y bajo en taninos. El proceso de ensilado en el genotipo alto en taninos disminuyó la concentración de dichas sustancias y mejoró la desaparición en el rumen de la MS, la PB y el almidón del grano. Dicho proceso fermentativo sería una técnica de bajo costo que permite aumentar la calidad nutricional del grano debido a la reducción de los efectos antinutricionales asociados con los taninos.

4. Capítulo 2:

DESAPARICIÓN RUMINAL DE UN GRANO DE SORGO ALTO EN TANINOS TRATADO CON POLIETILENGLICOL 4000 O UREA. EFECTOS DE LAS DOSIS, CONTENIDO DE HUMEDAD Y ANAEROBIOISIS. Experimentos 3, 4 y 5

4.1.- Introducción

Los taninos condensados presentes en el grano de sorgo tienen efectos negativos sobre la digestibilidad del mismo, afectando principalmente la fracción proteica (Duodu *et al.*, 2003) y por consiguiente del almidón encapsulado dentro de la matriz proteica. Dichas sustancias tienen una gran cantidad de grupos fenólicos que forman fuertes uniones puente hidrógeno en varios sitios de las proteínas (Hahn *et al.*, 1984), aunque también pueden acomplejarse con las mismas a través de uniones hidrofóbicas (Butler *et al.*, 1984). La fuerza de unión del complejo proteína-tanino depende de las características tanto de los taninos como de las proteínas involucradas (Silanikove *et al.* 2001). En general, las proteínas que se unen a los taninos son relativamente grandes y de estructura abierta y flexible, permitiendo dichas características que se aumenten las oportunidades para formar las uniones (Hagerman y Butler, 1981; Butler *et al.*, 1984). Además, los taninos tienen una mayor afinidad por las proteínas ricas en prolina, aminoácido característico de una de las principales proteínas constituyente del grano de sorgo (kafirinas o prolaminas), alterando su solubilidad y digestibilidad (Taylor *et al.*, 2007).

Los resultados del capítulo anterior muestran que el proceso de ensilado del grano alto en taninos genera una disminución en el contenido de dichas sustancias y una mejora en la degradabilidad del mismo. Otra técnica podría ser la utilización de sustancias que no tengan efectos nocivos para el animal, pero que aplicadas al grano disminuyan el efecto detrimental de los taninos, tales como el polietilenglicol 4000 (PEG-4000) y la urea.

El PEG-4000 es un detergente no iónico que se comporta como una molécula inerte para el animal ya que no se absorbe en el tracto digestivo, pero presenta la particularidad de tener alta afinidad por los taninos formando complejos insolubles que se mantienen estables en todo el tracto (Silanikove *et al.*, 1996a). Dicha sustancia no solo previene que se forme el complejo proteína-tanino, sino que además puede

desplazar a la proteína del complejo cuando ya está preformado (Barry y Manley, 1986). De esta manera actúa neutralizando los efectos negativos de los taninos sobre la fermentabilidad ruminal y resulta en un incremento en la producción de gas *in vitro* (Makkar *et al.*, 1995a, Getachew *et al.*, 2000, Cabral Filho *et al.*, 2005). Esta sustancia ha sido exitosamente probada en arbustos con alto contenido de taninos (Silanikove *et al.*, 1996 a y b, Howard *et al.*, 2002, Ben Salem *et al.*, 2005) y en granos de sorgo cosechados con 14% de humedad (Ford y Hewitt, 1979 a y b, Cabral Filho *et al.*, 2005, Reina *et al.*, 2007), pero se desconoce cuál sería su efecto si se lo aplica previamente al almacenamiento en anaerobiosis en un grano cosechado con alto contenido de humedad.

La urea demostró ser efectiva en conservar bajo condiciones de aerobiosis el grano cosechado con alto contenido de humedad en un medio alcalino (Russell *et al.*, 1988). Además la aplicación de urea en sorgos con alto contenido de taninos produce una notable disminución de dichas sustancias. Russell y Lolley (1989) indicaron que el tratamiento con distintos niveles de urea (2, 3 y 4% de urea en base a la materia seca) en sorgos cosechados con 12% de humedad, posteriormente reconstituidos a diferentes niveles de humedad (26, 30 y 34%) y almacenados en aerobiosis, produjo una rápida inactivación de los taninos, desapareciendo casi en su totalidad a los 21 días post-tratamiento. Esto indicaría que el tratamiento con urea reduce el contenido de taninos, y a través de esto, se podría mejorar la digestión del grano de sorgo, desconociéndose su comportamiento cuando dicho grano se conserva luego bajo condiciones de anaerobiosis, y a su vez comparado con el PEG-4000.

Con los siguientes experimentos se pretende evaluar el efecto de la utilización de diferentes dosis de PEG-4000 o urea sobre la desaparición *in situ* de granos de sorgo con alto contenido de taninos cosechados con dos niveles de humedad y almacenados bajo condiciones de anaerobiosis, así como también posibles interacciones entre tratamientos químicos y contenidos de humedad.

4.2.- Materiales y métodos

El material AT utilizado para estos tres experimentos fue el genotipo DA 49 (Dekalb®). Dicho híbrido fue sembrado en diferentes años, 2005 para el experimento 3 y 2006 para los experimentos 4 y 5. La confección de los silajes y la desaparición *in situ* de la materia seca (MS), la proteína bruta (PB) y el almidón (ALM) se realizó y evaluó de la misma manera que se detalló el capítulo anterior (Experimentos 1 y 2).

El experimento 3 fue conducido para establecer los efectos de la utilización de PEG-4000 o urea aplicados en diferentes dosis. Para ello el grano se cosechó con 35% de humedad y previo al ensilado fue tratado con una u otra sustancia en diferentes dosis. Las dosis de PEG-4000 fueron: 0, 0,1 y 1 g/g de PB del grano y las de urea de: 0, 2 y 4% en base a la materia seca del grano. Ambas sustancias fueron aplicadas tal cual, sin disolución previa, y homogeneizadas con el grano. De cada uno de las combinaciones dosis y sustancias se confeccionaron tres microsilos (repeticiones), obteniéndose en total 18 microsilos. Previo al momento de la cosecha se determinó el % PB, dato necesario para realizar la dosificación del PEG-4000 en todos los experimentos.

Los parámetros de calidad de los silajes (DIVMS, taninos, PB, ALM, MO, NH₃/NT y pH) fueron analizados con un diseño completamente aleatorizado (DCA) con las dosis anidadas dentro de cada sustancia de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + D_{j(i)} + \varepsilon_{ijk},$$

donde:

Y_{ijk} : variable observada,

μ : media general,

S_i : efecto de i-ésima sustancia,

$D_{j(i)}$: efecto de la j-ésima dosis anidada dentro de la i-ésima sustancia,

ε_{ijk} : error experimental.

El análisis estadístico de la desaparición *in situ* de la MS, PB y el ALM se realizó mediante un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con un arreglo factorial, utilizando el animal como bloque (repetición). Los tratamientos se generaron por la combinación de dos sustancias, tres dosis anidadas dentro de cada sustancia y dos tiempos de incubación (16 y 33 hs), siendo analizados con el siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + S_i + D_{j(i)} + T_k + (ST)_{ik} + (DT)_{j(i)k} + A_l + \varepsilon_{ijklm},$$

donde:

Y_{ijklm} : variable observada,

μ : media general,

S_i : efecto de i-ésima sustancia,

$D_{j(i)}$: efecto de la j-ésima dosis anidada dentro de la i-ésima sustancia,

T_k : efecto del k-ésimo tiempo de incubación,

$(ST)_{ik}$: efecto de la interacción entre la sustancia y el tiempo de incubación;
 $(DT)_{j(i)K}$: efecto de la interacción entre la dosis anidada dentro de cada sustancia y el tiempo de incubación,
 A_i : efecto del i -ésimo bloque (animal),
 ε_{ijklm} : error experimental.

Posteriormente, en el Experimento 4, además del efecto del tratamiento con PEG-4000 y urea en similares dosis a las planteadas anteriormente (Experimento 3), se pretendió evaluar una posible interacción con la humedad de cosecha. Para ello, el grano fue cosechado en dos momentos determinados por la humedad del mismo, es decir cuando alcanzaron 35 y 25% de humedad, tratado de manera similar al Experimento 3, y posteriormente almacenado en anaerobiosis para una correcta conservación.

Los parámetros de calidad de los silajes (DIVMS, taninos, PB, ALM, MO, NH_3/NT y pH) previo a la incubación en el rumen se analizaron bajo un DCA con arreglo factorial, combinando sustancias, dosis anidadas dentro de cada sustancia y la humedad de cosecha. El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + D_{j(i)} + H_k + (SH)_{ik} + (DH)_{j(i)K} + \varepsilon_{ijkl},$$

donde:

Y_{ijkl} : variable observada,

μ : media general,

S_i : efecto de i -ésima sustancia,

$D_{j(i)}$: efecto de la j -ésima dosis anidada dentro de la i -ésima sustancia,

H_k : efecto de la k -ésima humedad de cosecha,

$(SH)_{ik}$: efecto de la interacción entre la sustancia y la humedad de cosecha;

$(DH)_{j(i)K}$: efecto de la interacción entre la dosis anidada dentro de cada sustancia y humedad de cosecha,

ε_{ijkl} : error experimental.

Los resultados de la desaparición ruminal (incubación *in situ*) de la MS, PB y ALM fueron analizados en un DBCA con un arreglo factorial producto de la combinación de dos contenidos de humedad del grano (35 y 25%), dos sustancias (PEG-4000 y urea), tres niveles de dosis anidadas dentro de las sustancias y dos tiempos de incubación. El modelo general aplicado fue el siguiente:

$$Y_{hijklm} = \mu + H_h + S_i + D_{j(i)} + T_k + (HS)_{hi} + (HD)_{hj(i)} + (HT)_{hk} + (ST)_{ik} + (DT)_{j(i)k} + (HST)_{hik} + (HDT)_{hj(i)k} + A_l + \varepsilon_{hijklm},$$

donde:

Y_{hijklm} : variable observada,

μ : media general,

H_h : efecto de la h-ésima humedad de cosecha,

S_i : efecto de i-ésima sustancia,

$D_{j(i)}$: efecto de la j-ésima dosis anidada dentro de la i-ésima sustancia,

T_k : efecto del k-ésimo tiempo de incubación,

$(HS)_{hi}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y la sustancia;

$(HD)_{hj(i)}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y la dosis anidada dentro de cada sustancia,

$(HT)_{hk}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y el tiempo de incubación,

$(ST)_{ik}$: efecto de la interacción entre la sustancia y el tiempo de incubación;

$(DT)_{j(i)k}$: efecto de la interacción entre la dosis anidada dentro de cada sustancia y el tiempo de incubación,

$(HST)_{hik}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, la sustancia y el tiempo de incubación;

$(HDT)_{hj(i)k}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, la dosis anidada dentro de cada sustancia y el tiempo de incubación;

A_l : efecto del l-ésimo bloque (animal),

ε_{hijklm} : error experimental.

En el Experimento 5 se evaluó el efecto del tipo de almacenamiento (anaerobiosis y aerobiosis) en forma conjunta con dos niveles de humedad de cosecha y el agregado o no de PEG-4000. Para ello, el grano fue cosechado en dos momentos diferentes, con 35 y 25% de humedad (obtenidas en forma natural), parte del mismo se trató con 1 g de PEG-4000/ g PB del grano y la otra no (0 g PEG-4000/g PB del grano: testigo). Posteriormente, una parte de este material fue conservado en anaerobiosis y la otra almacenada en aerobiosis. Para evitar el deterioro del grano almacenado en aerobiosis con alto contenido de humedad, el mismo se colocó a -18°C . De esta manera quedaron conformados 8 tratamientos producto de la

combinación de las dos humedades de cosecha (35 y 25%), la aplicación o no del PEG-4000 (tratado y testigo) y el tipo de almacenamiento (anaerobiosis y aerobiosis).

Los parámetros de calidad (DIVMS, PB, taninos, MO y ALM) se analizaron bajo un DCA con un arreglo factorial por la combinación de dos tipos de almacenamiento (anaerobiosis y aerobiosis), el tratamiento con PEG-4000 (tratado y testigo) y dos humedades de cosecha (35 y 25%). El modelo matemático empleado respondió a la siguiente ecuación:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + D_j + H_k + (PD)_{ij} + (PH)_{ik} + (DH)_{jk} + (PDH)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl},$$

donde:

Y_{ijkl} : variable observada,

μ : media general,

P_i : efecto del i-ésimo tipo de almacenamiento,

D_j : efecto del j-ésimo tratamiento con PEG-4000,

H_k : efecto de la k-ésima humedad de cosecha,

$(PD)_{ij}$: efecto de la interacción entre el tipo de almacenamiento y el tratamiento con PEG-4000,

$(PH)_{ik}$: efecto de la interacción entre el tipo de almacenamiento y la humedad de cosecha,

$(DH)_{jk}$: efecto de la interacción entre el tratamiento con PEG-4000 y la humedad de cosecha,

$(PDH)_{ijk}$: efecto de la interacción entre el tipo de almacenamiento, el tratamiento con PEG-4000 y la humedad de cosecha,

ε_{ijkl} : error experimental.

Cabe aclarar que únicamente sobre los materiales que fueron sometidos al almacenamiento en anaerobiosis se determinó %NH₃/NT y el pH.

Los datos de desaparición *in situ* de la MS, la PB y el ALM se analizaron con un DBCA (utilizando el animal como bloque) con un arreglo factorial dado por la combinación de los factores humedad de cosecha, tipo de almacenamiento, el tratamiento con PEG-4000, y el tiempo de incubación y de acuerdo al siguiente modelo general:

$$Y_{hijklm} = \mu + H_h + P_i + D_j + T_k + (HP)_{hi} + (HD)_{hj} + (HT)_{hk} + (PD)_{ij} + (PT)_{ik} + (DT)_{jk} + (HPT)_{hik} + (HDT)_{hjk} + (PDT)_{ijk} + (HPDT)_{hijk} + A_l + \varepsilon_{hijklm},$$

donde:

Y_{hijklm} : variable observada,

μ : media general,

H_h : efecto de la h-ésima humedad de cosecha,

P_i : efecto del i-ésimo tipo de almacenamiento,

D_j : efecto del j-ésimo tratamiento con PEG-4000,

T_k : efecto del k-ésimo tiempo de incubación,

$(HP)_{hi}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y el tipo de almacenamiento;

$(HD)_{hj}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y el tratamiento con PEG-4000,

$(HT)_{hk}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha y el tiempo de incubación,

$(PD)_{ij}$: efecto de la interacción entre el tipo de almacenamiento y el tratamiento con PEG-4000,

$(PT)_{ik}$: efecto de la interacción entre el tipo de almacenamiento y el tiempo de incubación,

$(DT)_{jk}$: efecto de la interacción entre el tratamiento con PEG-4000 y el tiempo de incubación,

$(HPT)_{hik}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, el tipo de almacenamiento y el tiempo de incubación,

$(HDT)_{hjk}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, el tratamiento con PEG-4000 y el tiempo de incubación,

$(PDT)_{ijk}$: efecto de la interacción entre el tipo de almacenamiento, el tratamiento con PEG-4000 y el tiempo de incubación,

$(HPDT)_{hijk}$: efecto de la interacción entre la humedad de cosecha, el tipo de almacenamiento, el tratamiento con PEG-4000 y el tiempo de incubación.

A_l : efecto del l-ésimo bloque (animal),

ε_{ijklm} : error experimental.

En los tres experimentos los análisis se realizaron con el procedimiento GLM (General Linear Models) de SAS (2009) y las medias se compararon con el test de Tukey-Kramer. Se consideraron diferencias entre tratamientos estadísticamente significativas, y no significativas cuando la probabilidad del error fue menor o mayor al 5%, respectivamente.

4.3.- Resultados y discusión

4.3.1.- Experimento 3

El efecto del agregado de PEG-4000 o urea sobre las características químicas y fermentativas de los silajes a partir de los cuales se realizó la evaluación *in situ* se presenta en la Tabla 4. A nivel *in vitro*, el agregado de PEG-4000 incrementó la DIVMS respecto a la urea ($P < 0,01$). Por otra parte, los sorgos tratados con urea presentaron una menor concentración de taninos y mayores porcentajes de PB, N-NH₃/NT, y pH respecto a los tratados con PEG-4000 ($P < 0,05$; Tabla 4).

Tabla 4: Efectos de las sustancias (PEG-4000 o urea) sobre los parámetros químicos y fermentativos de los granos de sorgos con alto contenido de taninos almacenados húmedos en condiciones de anaerobiosis (promedio de las dosis).

Sustancia	DIVMS(%)	Taninos ¹	PB(%)	ALM(%)	MO(%)	N-NH ₃ /NT (%)	pH
PEG4000	69.0	187.8	8.2	62.0	97.5	3.92	4.41
Urea	59.6	82.1	11.3	61.2	97.7	19.31	6.90
Valor P	0.0078	<0.0001	<0.0001	0.6095	0.4985	<0.0001	<0.0001
E.E.M.	2.08	6.15	0.19	1.25	0.2	1.3	0.14

¹: mg eq. de ácido tánico/100 g de muestra, base materia seca (Método de Folin Denis). E.E.M.: error estándar de la media

Las diferentes dosis aplicadas dentro de cada sustancia tuvieron efectos sobre los parámetros químicos y fermentativos de los silajes. Las dosis de PEG-4000 modificaron la DIVMS y la concentración de taninos. A medida que aumentó la dosis aplicada de PEG-4000 hubo una mejora ($P < 0.05$) en la DIVMS (58.4, 70.1 y 77.6% para las dosis de 0, 0,1 y 1 g PEG-4000/g PB del grano respectivamente). De manera contraria, en la medida que se incrementaron las dosis de PEG-4000 aumentaron ($P < 0,05$) los niveles de taninos en el grano cuantificados por el método de Folin Denis (150.6, 185 y 227.7 mg eq. ácido tánico/100 g de muestra para las dosis de 0, 0,1 y 1 g PEG-4000/g PB del grano respectivamente).

A pesar que existen evidencias que el agregado de PEG disminuye la concentración de taninos (polifenoles) en alimentos con alta concentración de esta sustancia (Ben Salem *et al.*, 2005), dicha tendencia no se presentó en este ensayo. El PEG es una sustancia que posee en su estructura química una cierta cantidad de grupos oxidrilos similares que los polifenoles (Angenault, 1999), los cuales dan

reacciones positivas con los reactivos del método Folin-Denis, lo que origina una sobreestimación en la lectura total de polifenoles. Por último, los porcentajes de ALM, MO, PB y N-NH₃/NT no fueron afectados ($P>0,05$) por el tratamiento con PEG-4000 en ninguna de las dosis evaluadas.

Cuando se analizaron los efectos de las dosis de urea aplicadas a los granos, se halló que los tratados con 2% de urea presentaron la mayor DIVMS (74.2%) respecto a los no tratados (59.3%) y a los que se les aplicó 4% (58%) ($P<0,05$). Además, el agregado de 2% y 4% de urea provocó una disminución promedio del 68% de la concentración de taninos respecto al grano no tratado (48 vs 151 mg eq. ácido tánico/ 100g de muestra seca para tratados y testigo respectivamente). No se hallaron diferencias ($P>0,05$) en las concentraciones de taninos de los granos tratados con 2 y 4% de urea (55.6 vs 39.8 eq. ácido tánico/ 100g de muestra seca para 2 y 4% de urea respectivamente). Si bien, aplicando 2 y 4% de urea se obtuvo una notable disminución en la concentración de taninos, posiblemente la falta de respuesta del grano tratado con 4% se deba a que, dicha dosis sea muy alta y resulte tóxica para las bacterias ruminales.

Las aplicaciones de urea también modificaron los porcentajes de PB y N-NH₃/NT, aumentándolos respecto al testigo, siendo los valores hallados de 7.7 y 3.9%, 13.2 y 17.3%, 12.9 y 36.8% los valores de PB y N-NH₃/NT para las dosis de 0, 2 y 4% de urea en base a la materia seca, respectivamente. La alta concentración de N-NH₃/NT en los tratamientos con urea es producto de la hidrólisis de la dicha sustancia ante la presencia de agua, por lo cual no se puede interpretar como un parámetro clasificatorio de la calidad de los silajes. El pH de los silajes también se vio aumentado ($P<0,05$) con el agregado de urea produciendo una alcalinización del material (4.4, 7.9 y 8.4 para las dosis de 0, 2 y 4% de urea en base a la materia seca, respectivamente). La reconstitución del grano de sorgo con niveles de urea entre 2 y 6% y posterior almacenamiento en aerobiosis, produjo un incremento del pH alcanzando un valor promedio de 8,9 (Russell *et al.*, 1988) producto de la conversión de dicha sustancia a NH₃, similar a lo hallado en esta tesis.

Ben Salem *et al.* (2005) demostraron que los complejos proteína-taninos se rompen ante condiciones de acidez ($\text{pH}<3.5$) o de alcalinidad ($\text{pH}>7.5$). Una solución acuosa con urea ante condiciones de anaerobiosis libera amonio, produciendo una alcalinización del medio (Ben Salem *et al.*, 2005), lo cual desestabiliza los complejos proteína-taninos. En el presente ensayo, los granos tratados con urea presentaron valores de pH superiores a 7,5, límite a partir del cual se desestabiliza la unión entre la

proteína y el tanino. El efecto de la urea sobre la desactivación de los taninos fue presentando en sorgo (Russel y Lolley, 1989). Estos autores hallaron que, el tratamiento de sorgo con soluciones de urea que contenían 2, 3 y 4 g urea/100 ml de agua disminuyeron los niveles de taninos en aproximadamente un 70% comparado con el material no tratado, sin hallar diferencias entre las dosis de urea de manera similar a lo ocurrido ente trabajo.

Respecto a la desaparición *in situ*, en principio, se compararon los efectos del PEG4000 o la urea. Debido el tiempo de incubación no presentó ninguna interacción significativa ($P>0,05$) con ninguno de los factores, se muestran los datos promedios de ambos tiempos de incubación. En la figura 8 se puede observar que el tratamiento con PEG-4000 presentó una mayor desaparición *in situ* de la MS y el ALM, comparado respecto a la urea ($P<0,0001$). No se hallaron diferencias entre las sustancias cuando se evaluó la desaparición de la fracción proteica, y existió una tendencia a una mayor desaparición de los granos tratados con urea ($P=0.1013$, Figura 8).

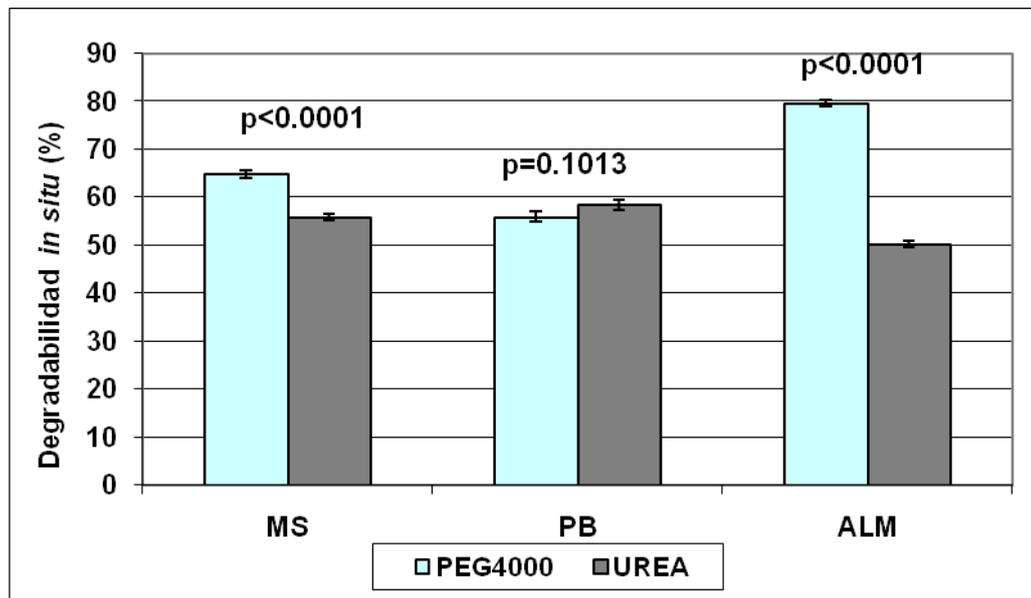


Figura 8: Efecto del agregado de PEG-4000 o urea sobre la desaparición ruminal del grano húmedo de sorgo.

Las comparaciones se realizaron entre sustancias dentro de una misma fracción (MS, ALM y PB, Test Tukey-Kramer).

La tendencia a una mayor desaparición de los granos tratados con urea sobre la fracción proteica pudo deberse a una sobre estimación de la desaparición de la proteína. En los granos con urea se agrego más PB de origen no proteico que es

rápida disponible en rumen. Cuando se calcula la PB incubada inicialmente, existe en el tratamiento con urea una porción de la PB que es de origen no proteico, aportada por la urea, la cual tiene una rápida disponibilidad en el rumen.

El efecto de las dosis en que fueron aplicadas ambas sustancias se muestra en la Tabla 5. Se presentan los valores promedios de los dos tiempos de incubación ya que la interacción tiempo de incubación x dosis (sustancia) no fue significativa ($P>0.05$).

Tabla 5: Desaparición *in situ* de la MS, la PB y el ALM de los grano de sorgos húmedos tratados con diferentes dosis de PEG-4000 o urea y almacenados en anaerobiosis.

DOSIS	MS (%)*		PB (%)*		ALM (%)*	
PEG-4000						
0	61,55	b	50,39	b	75,59	b
0,1	61,76	b	55,38	b	76,35	b
1	71,13	a	62,13	a	87,09	a
Valor P	<0,0001		<0,0001		<0,0001	
EEM	1,32		1,64		1,47	
UREA						
0	53,92	b	52,37	b	48,96	b
2	60,27	a	64,08	a	53,11	a
4	52,76	b	58,92	a b	47,86	b
Valor P	<0,0001		0,0004		0,0009	
EEM	1,17		1,96		1,00	

*Promedios con distintas letras difieren significativamente ($p<0.05$, Tukey-Kramer). E.E.M.: error estándar de la media.

Dentro del tratamiento con PEG-4000 la mejor respuesta, en desaparición *in situ*, se obtuvo con la dosis de 1g/g PB del grano, siendo esta superior ($P<0.05$) a las de 0.1 y 0 g/g de PB del grano. El agregado de 1g de PEG-4000/g de PB del grano incrementó en 15,6, 23,3 y 15,2% la desaparición ruminal de la MS, la PB y el ALM respecto al grano no tratado (Tabla 5). La dosis de 2% de urea demostró un aumento de la desaparición respecto a los granos no tratados (0% urea), siendo superior en un 11.7, 22.3 y 8.4% para las fracciones MS, PB y ALM respectivamente (Tabla 5).

Las diferencias obtenidas en la desaparición ruminal entre los granos tratados, con PEG-4000 o urea, respecto al testigo, es una medida indirecta de la actividad de

los taninos condensados y de su capacidad para reducir la fermentación ruminal (Makkar *et al.* 1995a, Herváz *et al.*, 2003). La reducción de la digestibilidad de la proteína es uno de los efectos más conocidos y citados en la bibliografía (Harris *et al.*, 1970; Hibberd *et al.*, 1985; Streeter *et al.*, 1990 b; Duodu *et al.*, 2003; Cabral Filho, 2004; Montiel *et al.*, 2011).

La inactivación de los taninos con el uso de PEG decrece la inhibición microbiana e incrementa la desaparición de nutrientes (Makkar, 2003) tal como fue observado en este trabajo. En granos de sorgo con alto contenido de taninos, Cabral Filho *et al.* (2005) y Reina *et al.* (2007) hallaron un incremento en la producción de gas *in vitro* cuando agregaron PEG en el medio de fermentación. La degradabilidad *in situ* con bolsas de dacrón fue mejorada en hojas de plantas con alto contenido de taninos tratadas con PEG-4000 (Silanikove *et al.*, 1996a). El PEG-4000 es un polímero sintético por el cual los taninos presentan una mayor afinidad que por las proteínas, formando así complejos con taninos hidrolizables y condensados en un amplio rango de pH (2-8.5) (Jones, 1965, Silanikove *et al.*, 1996a). Dicho polímero tiene la capacidad de formar enlaces puente hidrógeno con los OH fenólicos de los taninos (Makkar *et al.*, 1995a). De esta manera la proteína es liberada del complejo proteína-tanino por una reacción de intercambio con el PEG-4000 (Jones y Mangan, 1977). Al tratar con PEG-4000 alimentos que no contienen taninos, no se hallan respuestas por el agregado de esta sustancia, lo cual indica que este polímero actúa disminuyendo el efecto adverso de los taninos sobre la degradación ruminal (Silanikove *et al.*, 1996b). La suplementación con PEG, en dietas de animales que consumían alimentos con alto contenido de taninos, mejoró la digestibilidad de la materia seca y el aprovechamiento del nitrógeno, lo que pone nuevamente en evidencia el efecto de los taninos sobre las proteínas (Priolo *et al.*, 2002).

Los tratamientos con álcalis han sido utilizados en el grano de sorgo para reducir el contenido de taninos extractables y así incrementar su valor nutritivo (Price *et al.*, 1979 y Waichungo y Holt, 1995). La reconstitución del grano con sustancias alcalinas incrementa la tasa de desactivación de los taninos comparada con la reconstitución con agua sola (Price *et al.* 1979). La amonificación causa un notable incremento en la proteína digestible de granos de sorgo con alto contenido de taninos, pero dicho efecto no fue significativo en sorgo que no presentaban taninos (Price *et al.* 1979), lo cual indica el efecto positivo de la urea sobre la disminución de los taninos. Los taninos cuando son almacenados bajo condiciones de alcalinidad pierden su capacidad de unirse a las proteínas (Makkar y Becker, 1996). Dichos autores hallaron

que la recuperación de taninos con dos métodos de determinación decrece con el incremento del pH y esto estuvo acompañado por una disminución en la capacidad de precipitación de las proteínas (Makkar y Becker, 1996). Estos resultados sugieren que el efecto de los álcalis sobre los taninos conduce a la inactivación de los mismos convirtiéndolos en sustancias no reactivas (Waichungo y Holt, 1995). Bajo condiciones de alcalinidad los grupos fenólicos de los taninos se ionizan, lo cual desestabilizan la unión con las proteínas (Hagerman y Butler, 1978; Kumar y Singh, 1984). Además, Makkar (2003) indicó que la reducción de los taninos mediante un tratamiento con álcalis fue debido a la oxidación de los grupos fenólicos ante condiciones de altos pH y humedad. La desaparición de los taninos cuando se tratan los granos con urea puede ser atribuida a cambios en su solubilidad o en su reactividad, debida a la alteración del grupo activo de los taninos, lo cual ocasiona una disminución en la extracción y actividad de los mismos (Salunke *et al.*, 1989).

4.3.2.- Experimento 4

En el siguiente experimento se incluyó, además de las sustancias y las dosis respectivas, el efecto de la humedad de cosecha de los granos. Debido a que la interacción humedad de cosecha x sustancia no fue significativa ($P > 0,05$) para la mayoría de los parámetros químicos y fermentativos, en la Tabla 6 se presentan los efectos atribuidos a las sustancia sobre la calidad de los silajes. El análisis de las características químicas de los silajes indicó que el tratamiento con PEG-4000 produjo una DIVMS superior ($P < 0,0001$) a la del tratamiento con urea (Tabla 6). Por su parte, los granos tratados con urea presentaron una menor ($P < 0,0001$) concentración de taninos y mayores ($P < 0,0001$) concentración de PB y pH (Tabla 6). Dicho patrón fue similar al hallado en los silajes utilizados en el Experimento 3. Los porcentajes de almidón y materia orgánica no fueron afectados por las sustancias ($P > 0,05$).

Tabla 6: Efectos de las sustancias (PEG-4000 o urea) sobre los parámetros químicos y fermentativos de granos de sorgos con alto contenido de taninos almacenados húmedos en condiciones de anaerobiosis (promedios de las humedades de cosecha y las dosis).

Sustancia	DIVMS(%)	Taninos ¹	PB(%)	ALM(%)	MO(%)	pH
PEG4000	67,4	219,8	6,9	66,9	96,7	4,19
Urea	62,1	108,7	10,9	67,5	96,9	7,26
E.E.M.	0,59	2,6	0,15	0,84	0,21	0,11
Valor P	<0,0001	<0,05	<0,0001	0,61	0,68	<0,0001

¹: mg eq. de ácido tánico/100 g de muestra, base materia seca (Método de Folin Denis). E.E.M.: error estándar de la media

La interacción entre la sustancia x humedad de cosecha solo fue significativa ($P < 0,05$) para la variable N-NH₃/NT. Los granos tratados con PEG-4000 y cosechados con 35 y 25 % de humedad no presentaron diferencias ($P = 0,13$) en la producción de N-NH₃/NT, y en promedio fue del 4%. Sin embargo, la producción de N-NH₃/NT de los silajes tratados con urea fue superior en los granos que se cosecharon con 35% de humedad (18,4 % N-NH₃/NT) respecto a los cosechados con 25 % (10,2 % N-NH₃/NT). El contenido de humedad del grano determina la cantidad de urea que se hidroliza (Russell *et al.*, 1988), a mayor contenido de humedad mayor es la cantidad de nitrógeno amoniacal que se produce durante el almacenamiento.

La interacción dosis(sustancia) x humedad de cosecha fue significativa para la DIVMS ($P < 0,0001$), razón por la cual las dosis en las que se aplicaron el PEG-4000 o la urea originaron diferentes respuestas de acuerdo a la humedad con la que se cosechó el grano. Cuando el PEG-4000 o la urea se aplicaron al grano cosechado con 25% no hubo una mejora significativa ($P > 0,05$) en la DIVMS respecto al grano no tratado en ninguna de las dosis evaluadas (60,2 y 55,9% promedio de las dosis para PEG-4000 y urea respectivamente). Sin embargo, cuando se aplicaron las sustancias en los granos cosechados con 35% de humedad, la DIVMS aumentó respecto al grano no tratado. La dosis de 1g PEG/g de PB del grano aumentó la DIVMS en un 30% respecto al grano no tratado (82,1 vs 63,2%, para 1 y 0g PEG/g de PB respectivamente). No se hallaron diferencias ($P > 0,05$) entre las dosis de 2 y 4% de urea, y la mejora que produjeron las mismas fue en promedio un 21% respecto al grano sin urea (73,8 y 71,6% vs 59,9%, para 2, 4 y 0% de urea respectivamente).

Al igual que en el Experimento 3, los sorgos tratados con PEG-4000 presentaron una mayor ($P < 0,05$) cantidad de taninos, aumentando a medida que se incrementaron las dosis debido a la interferencia positiva que produce el PEG-4000 (179,8, 223,6 y 256 mg eq. ácido tánico/ 100g de muestra seca para dosis de 0, 0,1 y 1g PEG/g de PB respectivamente). La aplicación de diferentes dosis de PEG-4000 no modificaron ($P > 0,05$) las concentraciones de PB, ALM, MO de los silajes.

La cantidad de taninos en los granos tratados con urea se modificó de manera diferente de acuerdo a la humedad con la que se cosechó el grano, producto de que la interacción humedad de cosecha x dosis (sustancia) fue significativa ($P < 0,05$). A pesar que, dentro de cada humedad de cosecha hubo una disminución en la cantidad de taninos cuando se aplica urea, la reducción fue mayor y alcanzó un 76% cuando el grano fue cosechado con 35% de humedad (179,3, 46,6 y 38,3 mg eq. ácido tánico/ 100g de muestra seca cuando la urea se aplicó en dosis de 0, 2 y 4% respectivamente). Cuando la urea se aplicó en granos con menor contenido de humedad (25%), la reducción en los taninos fue en promedio del 33% (166,3, 119,7 y 102,9 mg eq. ácido tánico/ 100g de muestra seca cuando la urea se aplicó en dosis de 0, 2 y 4% respectivamente). Esto último podría explicar el hecho de que, a pesar de la disminución en el contenido de taninos, no se hayan obtenido respuestas positivas sobre la DIVMS cuando se trataron con urea los granos cosechados con menor humedad (25%). Butler *et al.* (1984) hallaron que los taninos presentes en el grano de sorgo tienen la capacidad de precipitar hasta 12 veces su peso en proteína, razón por la cual una disminución del 33% en la concentración de taninos posiblemente no alcance a ser suficiente para disminuir sus efectos negativos.

La interacción entre la humedad de cosecha x dosis(sustancia) también fue significativa para los parámetros fermentativos pH y N-NH₃/NT. Las diferentes dosis de PEG-4000 no modificaron ($P > 0,05$) los pH ni las concentraciones de nitrógeno amoniacal, siendo el promedio de las dosis y humedades observado de 4,19 y 4,01% para pH y N-NH₃/NT respectivamente. A diferencia del PEG-4000, las diferentes dosis de urea modificaron los pH y las concentraciones de N-NH₃/NT dependiendo de las dosis aplicadas y de las humedades con la que se cosecharon los granos (Tabla 7).

Tabla 7: Efectos de las diferentes dosis de urea y la humedad de cosecha sobre el pH y la concentración de N-NH₃/NT en granos de sorgos

Dosis ⁽¹⁾	25 % humedad		35 % de humedad	
	pH	N-NH ₃ /NT (%)	pH	N-NH ₃ /NT (%)
0	3,9 a	3,2 a	4,2 a	4,16 a
2	6,6 b	13,8 b	8,5 b	18,3 b
4	7,2 b	13,7 b	8,8 b	32,5 c
Valor P	<0,0001	0,003	<0,0001	0,0002
EEM	0,37	1,49	0,37	1,49

Promedios con distintas letras en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,05$, Tukey-Kramer). Las comparaciones se realizaron entre dosis dentro de una misma humedad de cosecha. ⁽¹⁾ Dosis de urea, % MS del grano. E.E.M.: error estándar de la media.

En la Tabla 7 se puede observar que el pH de los cosechados con 25% de humedad y tratados con 2 y 4% de urea fue en promedio de 7, el cual se encontró en el límite superior del rango de pH en el cual se produciría la ruptura del complejo proteína-tanino (3,5 a 7, Jones y Mangan, 1977). Esto podría estar indicando que solo una parte de los taninos fueron separados de las proteínas, y por lo tanto no se encontraría respuesta en la DIVMS. Además, a pesar de duplicarse la dosis de urea (2 vs 4) no se hallaron diferencias ($P > 0,05$) en el porcentaje de NH₃/NT, posiblemente porque no haya sido suficiente para disolver la urea la cantidad de agua presente en el grano. A diferencia de lo anterior, si la urea se aplica en granos con mayor contenido de humedad (35%), la hidrólisis de la misma aumenta el pH por encima de 8 e incrementa el % de N-NH₃/NT ($P < 0,05$). Russell *et al.* (1988) reconstituyeron granos a niveles de humedad de 22, 28 y 34% con soluciones de urea en dosis de 0, 2, 4 y 6% y obtuvieron niveles de pH que oscilaron entre 6,4 y 9,2 para las dosis de 0 y 6% respectivamente. Dichos resultados indican que la hidrólisis de la urea y la formación de N-NH₃ varían con la cantidad de urea aplicada pero la respuesta es diferente según la cantidad de agua que presente el grano (Russell *et al.*, 1988).

La PB de los granos aumentaron significativamente ($P < 0,05$) con el agregado de urea obteniéndose valores de 7,2, 12,3 y 13,1% para las dosis de 0, 2 y 4% respectivamente. Los porcentajes de almidón y de MO no fueron modificados por ninguno de los factores, y los promedios fueron de 67,5 y 96,9% para almidón y MO respectivamente.

Respecto a la desaparición a nivel ruminal, no existió una interacción significativa ($P>0.05$) entre las humedades de cosecha y las sustancias razón por la cual en la figura 9 se presentan los promedios de las humedades. Además, debido a que el tiempo de incubación no presentó interacción significativa ($P>0.05$) con ninguno de los factores, todos los datos que se presentan a continuación son promedios de ambos tiempos de permanencia en rumen. Al igual que en el experimento 3, la desaparición *in situ* de la MS y el ALM fueron superiores en el grano tratado con PEG-4000 respecto al tratado con urea, pero este último presentó una mayor desaparición de la PB (Figura 9).

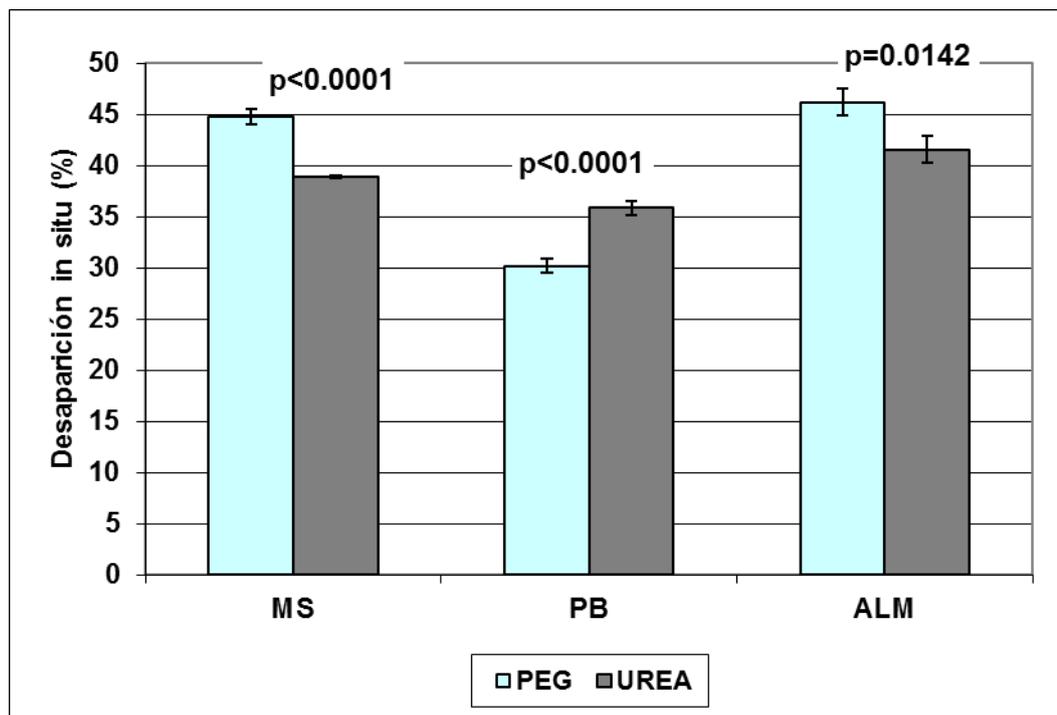


Figura 9: Efecto del agregado de PEG-4000 o urea sobre la desaparición ruminal del grano de sorgo (promedio de las humedades de cosecha).

Las comparaciones se realizaron entre sustancias dentro de una misma fracción (MS, ALM y PB. Test Tukey-Kramer).

La interacción humedad de cosecha x dosis(sustancia) resultó significativa ($P<0.05$) en las tres fracciones evaluadas, por lo cual se analizó el efecto de las dosis para cada nivel de humedad del grano. Cuando los granos fueron cosechados con 25% de humedad no se detectó ($P>0.05$) ningún efecto sobre la desaparición ruminal del grano ante el agregado de PEG-4000 o urea (Tabla 8). Este patrón fue similar al hallado sobre la DIVMS.

Tabla 8: Desaparición *in situ* de la MS, la PB y el ALM de los grano de sorgos cosechados con 25% de humedad, tratados con diferentes dosis de PEG-4000 o urea y almacenados en anaerobiosis.

Dosis	MS (%)	PB (%)	ALM (%)*
PEG-4000			
0	34,5	16,8	31,2
0.1	40,3	23,9	35,3
1	38,7	25,0	34,6
Valor P	0,20	0,1	0,76
EEM	2,24	2,48	4,7
UREA			
0	37,0	20,7	37,9 a
2	36,9	24,3	33,9 ab
4	31,2	28,4	25,5 b
Valor P	0,36	0,28	0,04
EEM	2,53	2,43	2,65

*Promedios con distintas letras difieren significativamente ($p < 0.05$. Tukey-Kramer). Las comparaciones se realizaron entre dosis dentro de una misma sustancia. E.E.M.: error estándar de la media.

Si bien el PEG-4000 y la urea son sustancias altamente solubles en agua, la falta de respuesta cuando se aplicaron las mismas en granos con 25% de humedad posiblemente se deba a que el contenido de agua de los mismos no sea suficiente para alcanzar a disolver dichas sustancias y mejorar el contacto con los granos. En los trabajos donde se obtuvieron repuestas positivas tratando granos secos altos en taninos con el PEG o la urea, dichas sustancias fueron disueltas previamente en agua generando la solución utilizada para reconstituir el grano (Russel y Lolley, 1989), o se agregaron en el medio líquido de los frasco empleados para medir la producción de gas (Sandoval Castro *et al.*, 2003; Reina *et al.*, 2007). Ben Salem *et al.* (2005) también aplicaron en diferentes ensayos urea y PEG previamente diluidas en agua obteniendo respuestas positivas. En la presente tesis ambas sustancias fueron mezcladas directamente con el grano previo la confección de los microsilajes y sin disolverse en agua, por lo tanto el agua que tenía el grano era la presente al momento de la cosecha.

Los grano cosechados con 35% de humedad y tratado con diferentes dosis de urea o PEG-4000 demostraron una repuesta positiva en la desaparición ruminal ante

el agregado de ambas sustancias ($P < 0,05$). En el caso del PEG-4000, la dosis de 1g/g de PB del grano mejoró la desaparición ruminal de la MS, la PB y el ALM en un 41, 81 y 22% en relación al grano no tratado, respectivamente (Tabla 9). El agregado de 2% de urea al material cosechado con 35% de humedad fue la dosis que mejor respuesta presentó. La misma incrementó respecto al grano no tratado en un 33, 49 y 22% la desaparición ruminal de la MS, la PB y del ALM, respectivamente (Tabla 9). El efecto positivo en la mejora de la desaparición de ambas sustancias fue similar al ensayo anterior (experimento 3).

Tabla 9: Desaparición *in situ* de la MS, la PB y el ALM de los grano de sorgos cosechados con 35% de humedad, tratados con diferentes dosis de PEG-4000 o urea y almacenados en anaerobiosis.

DOSIS	MS (%)*		PB (%)*		ALM (%)*	
PEG-4000						
0	44,6	b	27,5	b	53,5	b
0,1	47,4	b	38,0	b	57,0	b
1	62,9	a	49,9	a	65,3	a
Valor P	<0,0001		<0,0001		0,03	
EEM	1,75		1,42		2,95	
UREA						
0	37,4	b	28,3	b	46,2	b
2	49,6	a	42,3	a	56,6	a
4	41,1	b	47,1	a	48,9	b
Valor P	0,003		<0,0001		0,02	
EEM	1,86		1,47		3,05	

Promedios con distintas letras difieren significativamente ($p < 0,05$. Tukey-Kramer). EEM: error estándar de la media.

A pesar de que existe gran cantidad de información sobre el uso del PEG como secuestrante de taninos para mejorar la calidad del alimento, la misma está generada principalmente sobre arboles o arbustos en experimentos *in vitro* (Martínez Sáenz *et al.*, 2008, Getachew *et al.*, 2000, Palmer y Jones, 2000) e *in vivo* (Silanikove *et al.*, 1994, 1996b, Salawu *et al.*, 1997a). La utilización del PEG para secuestrar taninos en el grano de sorgo ha sido evaluada por Ford y Hewitt (citados por Ford y Hewitt, 1979 a) quienes lograron incrementar un 89% la digestibilidad verdadera del nitrógeno en ratas y pollos suplementadas con dosis de 0,1g PEG4000/ g PB. En otro ensayo, los

mismos autores incrementaron la dosis de PEG-4000 y obtuvieron un aumento desde 41 a 78 el valor nutricional relativo de un sorgo alto en taninos agregando 100 mg de PEG cada 78 mg PB (Ford y Hewitt, 1979 a), lo que sería equivalente a una dosis de 1,3 g PEG4000/g PB. La misma dosis aplicada en sorgos con bajo contenido de taninos no modificó el valor nutricional de los mismos (Ford y Hewitt, 1979 a), lo cual indica el efecto directo del PEG-4000 sobre los taninos. El PEG-4000 aplicado en granos de sorgos en ensayos aumentó la producción de gas en un 8 y 20% con dosis muy superiores a la empleada en este trabajo (11,6 y 14 g PEG4000/g PB, Sandoval Castro *et al.*, 2003 y Cabral Filho *et al.*, 2005, respectivamente). Reina *et al.* (2007) incubando granos de sorgos a los que les agregaron PEG-8000 a una dosis de 1 g PEG-8000/ 1 g de sorgo (lo que equivale a 11,6 g PEG-8000/g PB) hallaron un incremento en la producción de gas *in vitro* del 12% durante las primeras doce horas de iniciada la incubación y una reducción en el período de latencia del 3,4%. A pesar de que en el presente trabajo no se hallaron respuestas con la menor dosis (0,1 g PEG-4000), se logró aumentar significativamente la desaparición ruminal de las fracciones proteica y almidonosa del grano en un 82 y 22% respectivamente con la dosis de 1 g PEG-4000/g PB aplicada a granos con 35% de humedad. Esto indicaría que para rumiantes serían necesarias dosis mayores a 0,1 g PEG-4000/g PB para obtener respuestas positivas.

La urea no solo posee el potencial de preservar los granos de sorgo con alto contenido de humedad, sino también de mejorar la calidad alimenticia de los mismos por la desactivación de los taninos. Dicha mejora es altamente dependiente de la humedad que posee el grano cuando se trata, ya que a mayor humedad mayor desactivación (Russel y Lolley, 1989). El álcali generado por la hidrólisis de la urea en un medio húmedo aumenta la tasa de inactivación de los taninos, respecto a si se reconstituye solo con agua o con otros álcalis (Russel y Lolley, 1989). El agregado de 2% de urea a los granos cosechados con alta humedad (35%) mejora notablemente la desaparición *in situ* de las fracciones proteica y almidonosa del mismo (Tabla 9). A pesar que con ambas dosis (2 y 4%) se produjo una notable disminución del contenido de taninos, la falta de respuesta cuando se aplica el doble de urea (4%) posiblemente se deba a que con dicha cantidad se genere un microambiente alrededor de las partículas que sea nocivo para los microorganismos encargados de degradar el grano a nivel ruminal. Similares patrones de respuestas se obtuvieron en las evaluaciones *in vitro* e *in situ* del Experimento 3. Al igual que en este trabajo, Russel y Lolley (1989)

hallaron que el incremento del nivel de urea de 2 a 4% no tuvo efecto en la inactivación de los taninos.

Existen cuatro tipos de uniones posibles entre los taninos y las proteínas, siendo generalmente inestables y con enlaces individuales que pueden separarse y volverse a formar, dependiendo esto principalmente del pH. Kumar y Singh (1984) sugirieron que los cuatro posibles tipos de uniones que participan en el complejo son: unión por puentes de hidrógeno, unión por interacciones hidrofóbicas, unión por interacciones iónicas y unión mediante enlaces covalentes. A pesar de ello, Butler *et al.* (1984) indicaron que las uniones entre los taninos condensados presentes en el grano de sorgo y las proteínas serían mediante puentes de hidrógeno y asociaciones hidrofóbicas, sin encontrarse evidencias de que se produjesen enlaces covalentes entre ambas moléculas. Los taninos almacenados bajo condiciones de alcalinidad pierden su capacidad de unirse a las proteínas, sugiriendo que hay una transformación de los taninos ante dichas condiciones que conducen a la inactivación de los mismos (Makkar y Becker, 1996). Los hidroxilos fenólicos son los únicos grupos de ionización de los taninos condensados, y se ionizan solo en pH muy altos (Hagerman y Butler, 1978), donde además la mayoría de las proteínas del grano llevan cargas netas negativas (Butler *et al.*, 1984). Ante estas condiciones, las proteínas podrían desarrollar fuerzas repulsivas más que de atracción entre las moléculas (Haslan, citado por Salunkhe *et al.*, 1990). Estas reacciones serían las responsables de la ruptura del complejo proteína-tanino, y por consiguiente del incremento en la desaparición de la proteína y el almidón del grano de sorgo cuando es sometido a condiciones de alcalinidad con el agregado de urea.

Los incrementos en las desapariciones de los granos incubados con PEG-4000 o urea, se deberían a la inactivación de los taninos que se acomplejaron con el PEG-4000 mediante uniones puente hidrógeno o se separaron de la proteína por la desestabilización que le produce el medio alcalino generado por la urea. Comparando ambas sustancias, en los Experimentos 3 y 4, el efecto positivo del PEG-4000 fue superior al de la urea sobre la desaparición *in situ* (Figuras 8 y 9). Ben Salem *et al.* (2002) también observaron un mejor efecto de la adición de PEG-4000 respecto a la suplementación con urea sobre el crecimiento y la actividad microbiana en dietas ricas en taninos, a pesar de que la urea también tuvo efectos benéficos. Comparando la suplementación con PEG-4000 vs. urea previo al suministro *Acacia saligna* (planta rica en taninos), se hallaron en ovinos mayores digestibilidades con el PEG-4000 respecto a la urea (Howard *et al.*, 2002). Dicha diferencia entre los tratamientos con urea o con

PEG-4000 posiblemente se deba a que si bien, el medio alcalino generado por la urea en los silajes desestabiliza las uniones entre los polifenoles y las proteínas del grano, no todas las uniones sean rotas como indican Jones y Mangan (1977), o a que parte de los taninos que se liberan del complejo podrían estar inhibiendo la acción de enzimas microbianas (McSweeney *et al.*, 2001). Por otra parte, la formación del complejo PEG-4000-taninos se mantendría estable en el ambiente ruminal donde se incubó ($6,23 \pm 0,37$, pH promedio de las tres animales y de las 24 horas de un día), quedando retenidos los taninos en el complejo y reduciendo de manera más eficiente la actividad negativa de los mismos sobre la proteína, habiéndose aplicado en una relación 1:1.

4.3.3.- Experimento 5

Los resultados del Experimento 3 demostraron que el agregado de 1 g de PEG/g de PB del grano fue la dosis con la que se logró aumentar la desaparición ruminal del grano alto en taninos. Por esa razón dicha dosis fue la que se utilizó para este experimento.

Los tratamientos no fueron afectados ($P > 0,05$), en lo que respecta a los porcentajes de PB, ALM y MO de los granos, por el tipo de almacenamiento, la humedad de cosecha y el tratamiento con PEG-4000. Los valores promedios de los tratamientos para las fracciones PB, ALM y MO de los granos fueron de 6,64, 62,6 y 97,2% respectivamente.

La concentración de NH_3/NT y el pH de los granos que se almacenaron en anaerobiosis no fueron afectados ($P > 0,05$) por la humedad de cosecha ni el tratamiento con PEG-4000, y en promedio fueron de 4,03% y 4,36, respectivamente. El tipo de almacenamiento afectó ($P < 0,05$) la DIVMS, aumentándola en aproximadamente un 20% en los granos que fueron sometidos a anaerobiosis, siendo independientemente de la humedad de cosecha y del tratamiento con PEG-4000 (interacciones tipo de almacenamiento x humedad de cosecha y tipo de almacenamiento x tratamiento con PEG-4000 no significativas, $P = 0,52$ y $P = 0,17$ respectivamente). La DIVMS promedio para los granos almacenados en anaerobiosis y en aerobiosis fue de 65,6 y 55,2% respectivamente.

El efecto del tratamiento con PEG-4000 sobre la DIVMS fue dependiente de la humedad con la cual se cosecho el grano ($P < 0,01$ para la interacción humedad de cosecha x tratamiento con PEG-4000). La aplicación de PEG-4000 solo fue efectiva en

mejorar la DIVMS ($P < 0,001$) sobre los granos que contenían 35% de humedad (Tabla 10), siendo esta respuesta coincidente con la hallada en el experimento anterior (experimento 4). Además, al igual que en experimentos anteriores (capítulo 1) se puede observar que a medida que aumenta la humedad de cosecha se observa una notable mejora ($P < 0,05$) en la DIVMS, dentro de una misma dosis (Tabla 10).

Tabla 10: Efecto de la humedad de cosecha y el tratamiento con PEG-4000 sobre la DIVMS (%) del grano de sorgo.

PEG-4000	Humedades de cosecha (%)			
	25	35	Valor P= ⁽¹⁾	EEM ⁽³⁾
Testigo	51,2	63,8	0,0002	1,54
Tratado	53,0	74,5	0,0003	1,54
Valor P= ⁽²⁾	0,98	0,0009		
EEM ⁽⁴⁾	1,54	1,54		

- (1) Valor P correspondiente a la comparación entre las humedades de cosecha para un mismo tratamiento de PEG-4000.
- (2) Valor P correspondiente a la comparación entre granos tratados y no tratados con PEG-4000 para una misma humedad de cosecha.
- (3) Error estándar de la media.

Los niveles de taninos en el grano fueron afectados en forma conjunta por el tipo de almacenamiento y el tratamiento con PEG-4000, dado que la interacción tipo de almacenamiento x tratamiento con PEG-4000 fue significativa ($P = 0,0032$). Cuando los granos fueron sometidos almacenados en anaerobiosis se produjo una notable disminución ($P < 0,05$) en la concentración de los taninos, alcanzando reducciones de un 45,5 y 42,6% para el testigo y los granos tratados con PEG-4000 respectivamente (Tabla 11). Para un mismo tipo de almacenamiento, el agregado de PEG-4000 produjo un incremento ($P > 0,05$) en los niveles de taninos (Tabla 11), producto de la interferencia positiva que produce el polietilenglicol en la técnica de Folin-Denis como se explico en los ensayos anteriores. Por último, la humedad de cosecha no tuvo efectos sobre los niveles de taninos ($P = 0,29$) y los valores promedios fueron de 227,4 y 283,3 mg eq. ácido tánico/ 100g de muestra seca para los granos cosechados con

25 y 35% de humedad, respectivamente. Esto último fue coincidente con los resultados obtenidos en experimentos anteriores (Capítulo 1).

Tabla 11: Efectos del tipo de almacenamiento y el tratamiento con PEG-4000 sobre los niveles de taninos (mg eq. ácido tánico/ 100g de muestra seca) del grano de sorgo.

PEG-4000	Tipo de almacenamiento			
	Anaerobiosis	Aerobiosis	Valor P= ⁽¹⁾	EEM ⁽³⁾
Testigo	172,0	315,8	<0,0001	5,38
Tratado	223,5	389,1	<0,0001	5,38
Valor P= ⁽²⁾	<0,0001	<0,0001		
EEM ⁽³⁾	5,38	5,38		

(1) Valor P correspondiente a la comparación entre los tipos de almacenamiento para un mismo tratamiento de PEG-4000

(2) Valor P correspondiente a la comparación entre tratamientos con PEG-4000 para un mismo tipo de almacenamiento.

(3) Error estándar de la media.

La desaparición *in situ* de la MS, PB y ALM fue afectada por el tipo de procesamiento, observándose que el proceso de ensilado incrementó ($P < 0,05$) la desaparición independientemente de la humedad de cosecha del grano y las dosis de PEG-4000, debido a que las interacciones entre dichos factores no fueron significativas ($P > 0,05$, Figura 10). El aumento en la desaparición fue del 12, 17 y 53% sobre la MS, ALM y PB del grano. La mejora en la desaparición ruminal estuvo en concordancia con un aumento en la DIVMS y una disminución en la concentración de taninos cuando el grano fue almacenado en condiciones de anaerobiosis (Tablas 10 y 11).

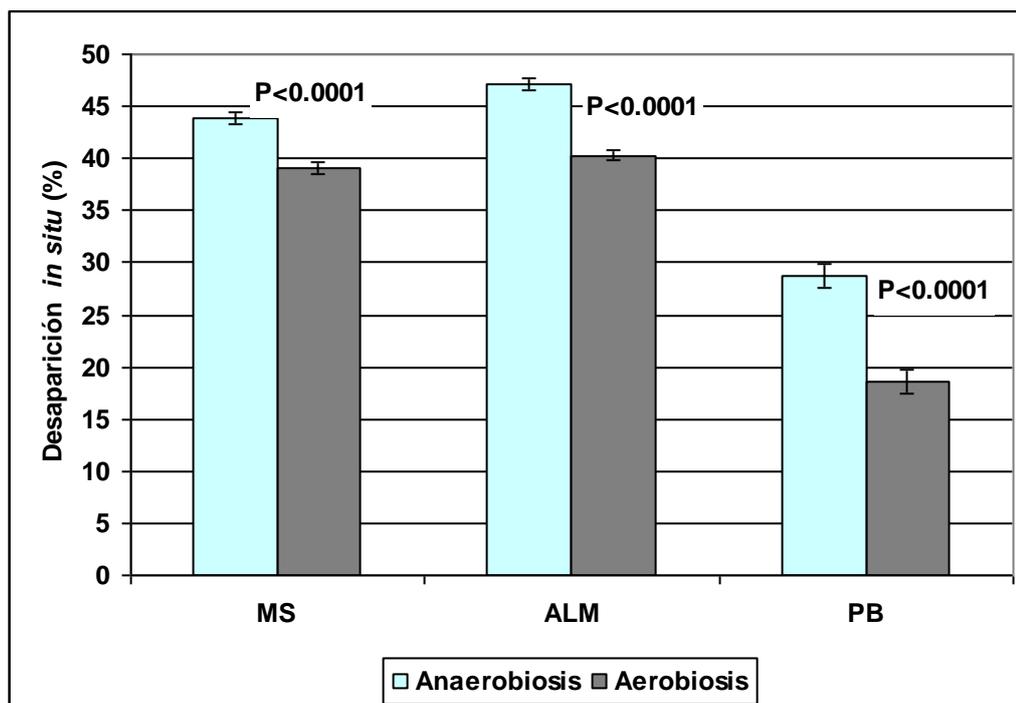


Figura 10: Efecto del tipo de almacenamiento de un grano de sorgo con alto contenido de taninos sobre la desaparición *in situ*.

Las comparaciones se realizaron dentro de una misma fracción (MS, ALM y PB. Test Tukey-Kramer).

La aplicación de PEG-4000 generó una respuesta sobre la desaparición *in situ* que fue independiente del tipo de almacenamiento ya que la interacción tipo de almacenamiento x tratamiento con PEG-4000 no fue significativa ($P > 0,05$). A su vez, dicha respuesta fue diferente según la humedad con la que fue cosechado el grano (interacción humedad de cosecha x tratamiento con PEG-4000 significativa, $P < 0,05$).

No se halló respuesta al agregar PEG-4000 al grano cosechado con 25% de humedad, siendo las desapariciones de los granos tratados con 1 g PEG/g PB similares ($P > 0,05$) a la del testigo (0 g PEG/g PB) en todas las fracciones evaluadas. Sin embargo, cuando el PEG-4000 se aplicó en los granos cosechados con 35% de humedad, las desapariciones *in situ* fueron superiores respecto al testigo en un 35, 31 y 66% para las fracciones MS, ALM y PB respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12: Desaparición *in situ* de la MS, PB y ALM de granos cosechados con diferentes contenidos de humedad y tratados con PEG-4000.

PEG-4000	MS (%)	PB (%)	ALM (%)
25% humedad			
Testigo	32,5	16,1	30,2
Tratado	34,8	18,7	32,8
Valor P	0,1827	0,0894	0,6291
EEM	0,81	0,82	1,58
35% humedad			
Testigo	41,9	22,6	48,5
Tratado	56,7	37,6	63,6
Valor P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
EEM	0,77	0,75	1,67

E.E.M.: error estándar de la media.

En la mayoría de los trabajos donde se aplica polietilenglicol al alimento que se le pretende mejorar la digestibilidad, el conjunto PEG-alimento no fue sometido a un ambiente anaeróbico (Ford y Hewitt, 1979 a y b, Cabral Filho *et al.*, 2005, Reina *et al.*, 2007). En este trabajo, la aplicación de PEG-4000 fue eficiente en mejorar la desaparición ruminal en los granos con mayor contenido de humedad (35%), en forma consistente como el experimento anterior (Experimento 4). Además, dicha mejora se mantuvo independientemente que el grano haya sido almacenado bajo condiciones de anaerobiosis o no. Eso indicaría que la estabilidad del complejo que se forma entre el PEG y los taninos se mantendría completamente estable a pesar del proceso fermentativo que sufre el grano cuando es almacenado en anaerobiosis. Esto se debería a que el pH promedio de los silajes fue de 4,36, el cual estuvo dentro del rango entre 2 y 8,5 donde se mantiene estable el complejo PEG-taninos (Jones, 1965; Silanikove *et al.*, 1996 a).

Los niveles de taninos condensados decrecieron en genotipos altos taninos con la fermentación que se produce durante el proceso de ensilado cuando se somete a una condición anaeróbica (Tabla 11). Los granos no tratados con PEG-4000 presentaron una disminución en la cantidad de taninos de aproximadamente un 45% con el proceso de ensilado. Cummins (1971) informó que el nivel de taninos puede reducirse entre un 4 a un 10% luego de la fermentación producida durante el proceso de ensilado del grano. Por su parte, Osman (2004) logró disminuir la concentración de

los taninos entre un 15 al 35% en granos de sorgo y mejorar significativamente la digestibilidad *in vitro* de la fracción proteica. Hassan y El Tinay (1995) informaron que la fermentación mejora las digestibilidades del almidón y la proteína del grano debido a una disminución en el contenido de taninos. En otras especies, Makkar y Singh (1993) hallaron que la cantidad de taninos de hojas frescas de roble (*Quercus incana*) almacenadas bajo condiciones de aerobiosis decreció en menor medida respecto cuando las hojas se almacenaron en condiciones de anaerobiosis.

Cambios en la estructura y reactividad de los taninos pueden ocurrir durante el proceso fermentativo del silaje, lo cual repercute en una mejora en la digestibilidad de la proteína y el almidón del grano. La reducción en los niveles de taninos probablemente se deba a una inactivación de los mismos por las condiciones anaeróbicas y el bajo pH producto de la acumulación de ácido láctico que se genera en los silajes (McSweeney *et al.*, 1999). Ante estas condiciones se produciría una modificación de la molécula que provocaría una disminución en su extractabilidad y actividad inhibitoria de los mismos.

4.4.- Conclusiones

Las aplicaciones de PEG-4000 o de urea en granos de sorgos altos en taninos fueron beneficiosas para reducir el efecto negativo de los taninos sobre la desaparición *in situ*. Dicha mejora fue dependiente de las dosis en que se aplicaron y de la humedad que contenía el grano al momento de recibir el tratamiento. Solo se obtuvieron respuestas positivas en granos cosechados con 35% de humedad y tratados con 1g PEG4000/ g PB del grano o con 2% de urea en base a la materia seca. El proceso de ensilado del grano, ocurrido durante el almacenamiento en anaerobiosis, no afectó la capacidad del polietilenglicol 4000 para capturar los taninos.

5. Capítulo 3

DIGESTIBILIDAD TOTAL APARENTE Y METABOLISMO RUMINAL EN BOVINOS ALIMENTADOS CON DIETAS A BASE DE GRANO HÚMEDO DE SORGO ALTO EN TANINO TRATADO CON POLIETILENGLICOL-4000 O UREA¹.

Experimento 6.

5.1.- Introducción

El grano de sorgo presenta un importante potencial para los sistemas de alimentación de bovinos, pero existen en el mercado varios cultivares con altos niveles de compuestos secundarios como los taninos condensados (Hahn; Rooney, 1986). Los taninos condensados son sustancias polifenólicas que poseen la capacidad de formar complejos insolubles con las proteínas, lo cual provoca una disminución de su digestibilidad (Cabral Filho, 2004). Altos niveles de taninos en un alimento pueden disminuir el consumo voluntario (Landau *et al.*, 2000), la digestibilidad de los nutrientes y la retención del N (Silanikove *et al.*, 1994).

Se han estudiado sustancias como el polietilenglicol y la urea, con el objeto de disminuir el efecto detrimental de los taninos a través de la desactivación de los mismos. El polietilenglicol con un peso molecular de 4000 (PEG-4000), 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; Mangan, 1977; Silanikove *et al.*, 1996). Dicha sustancia puede evitar la formación o desplazar a la proteína del complejo proteína-tanino (Silanikove *et al.*, 2001). La utilización de PEG-4000 para secuestrar taninos en granos de sorgos secos ha sido probada con éxito en ensayos de alimentación realizados en ratas y pollos, y también en pruebas *in vitro*, aumentando la digestibilidad de la fracción proteica en sorgos con alto contenido de taninos (Ford; Hewitt, 1979; Sandoval Castro *et al.*, 2003).

La urea también ha sido utilizada para disminuir el efecto negativo de los taninos. Varios 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 *et al.*, 1988; Russell; Lolley, 1989).

¹ Este capítulo fue publicado en la Revista Archivos de Zootecnia (año 2012, Vol: 61, paginas: 235-244) como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Agrarias.

En ensayos anteriores (Capítulo 2) se obtuvieron importantes mejoras en la desaparición a nivel ruminal de sorgos cosechados con alto contenido de humedad tratados con PEG-4000 o urea. Dicha respuesta fue dependiente de las dosis, y los mejores resultados se obtuvieron con 1g PEG-4000/g PB y con 2% de urea en base a la materia seca del grano, razón por la cual dichas dosis se utilizaron en este ensayo.

El objetivo del presente trabajo fue comparar los efectos, sobre la digestibilidad aparente *in vivo*, el ambiente ruminal y metabolitos plasmáticos, de las dietas suministradas a bovinos cuando se tratan con PEG-4000 o urea un grano húmedo de sorgo con alto contenido de taninos y se almacena en anaerobiosis.

5.2.- Materiales y métodos

El experimento se realizó en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce (provincia de Buenos Aires, Argentina; 37°45' latitud sur, 50°18' longitud oeste).

El ensayo se realizó bajo un diseño en cuadrado latino con 3 animales, que consumieron una dieta basada en grano de sorgo almacenado con alto contenido de humedad en anaerobiosis, modificado de acuerdo a los tratamientos, y 3 períodos experimentales.

Para confeccionar los silajes de grano húmedo se utilizó el híbrido de sorgo alto en taninos DA49®, sembrándose una superficie de 2 has con una densidad de 6 semillas por metro lineal de surco y 50cm entre hilera. Cuando los granos alcanzaron el 35% de humedad fueron cosechados, molidos con una máquina embudadora de granos, tratados con PEG-4000 o urea, y colocados dentro de tanques de cemento (uno por cada tratamiento) de 1 m³ donde se produjo la compactación (pisando los granos) para generar la anaerobiosis.

En el momento de la confección de los silajes quedaron definidos los tres tratamientos:

1. Testigo (T): grano ensilado.
2. Tratamiento con PEG-4000 (P): grano ensilado con la adición de 1g de PEG-4000/g de proteína bruta (PB) del grano.
3. Tratamiento con urea (U): grano ensilado con la adición de 2% de urea en base a la materia seca (MS) del grano.

La dieta estuvo compuesta (base MS) por: 70% de grano húmedo de sorgo (adicionado o no de PEG-4000 o de urea, de acuerdo al tratamiento), 14 % de afrechillo de trigo, 6% de harina de soja, 9% de heno de alfalfa y 1% núcleo vitamínico-mineral con monensina. Para que las raciones resultasen isoproteicas los tratamientos de P y T fueron corregidos con urea al momento del suministro de la ración, alcanzando todas las dietas un valor de PB total del 13,4%. Para el caso de la dieta que contenía grano con urea, el mismo no fue previamente oreado, ya que existen antecedentes que dicho proceso no es necesario y además no se observó rechazo por parte de los animales con ese nivel de urea.

Al principio de cada período experimental se tomaron muestras representativas de cada uno de los componentes de las dietas para realizar las siguientes determinaciones: materia orgánica (MO, AOAC, 1995), almidón (AOAC, 1995), digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS, usando el sistema de incubación Daisy II (Ankom Technology, Macedon, NY)) y PB (Horneck; Miller, 1998). El pH (Baron *et al.*, 1986), el N-NH₃/NT(Chaney; Marbach, 1962) y taninos por el método de Folin-Denis (Magalhães *et al.*, 2001) solo se determinaron en los granos de sorgo.

Tabla 13: Parámetros químicos y de calidad de los diferentes componentes de las dietas.

Ingredientes	MO (%)	Almidón (%)	PB (%)	DIVMS (%)	pH	N-NH ₃ /NT (%)	Taninos *
Heno alfalfa ⁽¹⁾	90,1 (1,13)	--	21,7 (1,06)	73,9 (1,34)	--	--	--
Afrechillo de trigo ⁽¹⁾	91,6 (0,92)	23,0 (0,85)	15,2 (0,57)	74,4 (1,41)	--	--	--
Harina de soja ⁽¹⁾	93,3 (2,55)	--	46,8 (1,27)	95,5 (1,48)	--	--	--
Sorgo P ⁽¹⁾	98,4 (0,57)	72,3 (0,35)	6,6 (0,20)	83,8 (0,25)	4,2 (0,15)	4,6 (0,25)	258,3 (1,53)
Sorgo U ⁽¹⁾	98,2 (0,8)	72,2 (0,75)	9,1 (0,1)	76,4 (1,65)	8,1 (0,21)	20,6 (0,75)	64,5 (1,89)
Sorgo T ⁽¹⁾	97,5 (0,57)	71,5 (0,35)	6,8 (0,2)	72,2 (0,25)	4,6 (0,15)	4,1 (0,25)	217,3 (1,53)

⁽¹⁾ Valor promedio y desvío estándar ubicado entre paréntesis.* mg de ácido tánico/100g de muestra base materia seca.

Para determinar la digestibilidad aparente *in vivo* se utilizaron tres novillos Aberdeen Angus de 312 ± 38 kg de peso vivo, provistos de una cánula ruminal (11 cm de diámetro interno). Los animales fueron operados bajo anestesia total para la colocación de las cánulas. Durante el experimento, se alojaron en corrales individuales con piso de cemento y libre acceso al agua fresca. Diariamente se higienizaron los corrales para sacar restos de orina y materia fecal, y se reciclaba completamente el agua de bebida.

Cada período experimental constó de 20 días, divididos en dos fases. La primera fase (fase pre-experimental) tuvo una duración de 16 días, durante los cuales los animales fueron acostumbrados a cada uno de los tratamientos ofreciéndoles la ración completamente mezclada y en partes iguales a las 8:00 y 20:00 horas. En este período se evaluó el consumo potencial (*ad libitum*) de cada animal durante cuatro días consecutivos (días 13, 14, 15 y 16 del período), estimándose por diferencia entre oferta y rechazo. A partir de dicho registro se fijó el consumo al 95% del consumo potencial para asegurar la ingesta total de todos los componentes de la dieta. En la segunda fase (fase experimental), cuya duración fue de 4 días, se efectuó el correspondiente registro de las variables en estudio.

Para estimar la producción total de heces se utilizó óxido crómico (Cr_2O_3) como marcador externo, suministrándose 10g de Cr_2O_3 /animal/día y utilizando como vehículo el afrechillo de trigo que fue granulado junto con el marcador. Se recolectaron 4 muestras de heces por día cada 6 horas durante tres días consecutivos, desplazando en 2 horas el inicio del muestreo entre días a fin de obtener una muestra compuesta cada dos horas durante un período de 24 horas. Sobre las muestras de heces se determinó la MS, MO, PB, almidón y la concentración de Cr usando el método de López *et al.* (1988), citado y descrito por Vicente *et al.* (2004). Las muestras de heces fueron incineradas a 500°C y posteriormente tratadas con HNO_3 , hirviendo dicha mezcla durante tres minutos. Luego fueron diluidas con agua, filtradas y almacenadas hasta su posterior análisis. La curva de calibración se realizó generando soluciones con concentraciones conocidas de Cr a las que se les agregaban heces que no contenían Cr. Las determinaciones de Cr se realizaron mediante espectrofotometría de absorción atómica.

La producción total de heces se estimó mediante la siguiente relación g Cr_2O_3 suministrado por día/concentración Cr_2O_3 en heces. A partir de dichos resultados se determinaron los coeficientes de digestibilidad aparente *in vivo* de la MS, MO, PB y almidón de las dietas con la fórmula propuesta por Schneider; Flatt (1975) donde:

Coeficiente de digestibilidad y (%)= [(g y consumido – g y en heces)/g y consumido]*100, donde y es el nutriente a evaluar (MS, MO, PB o almidón). Debido a que el PEG-4000 es indigestible y no absorbible, previo al cálculo de la digestibilidad de la MS se le restó a la producción de heces el consumo de PEG-4000.

Durante el último día de la fase experimental se extrajeron muestras de líquido ruminal cada 4 horas durante un período de 24 horas para determinar inmediatamente el pH (Orion pH-metro portátil 250^a, Orion Research Inc., Boston, MA). Una muestra de 4 ml de ese líquido fue acidificada con 4 ml de HCL 0,2N, posteriormente fue centrifugada para determinar en el sobrenadante la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) por espectrofotometría (Chaney; Marbach, 1962). Las muestras de líquido ruminal destinadas a la estimación de AGV fueron acidificadas con SO₄H₂ (100 ml líquido ruminal con 1 ml de SO₄H₂). La determinación de ácidos grasos volátiles se realizó en un cromatógrafo de gases (Shimadzu modelo GC-14) con N₂ como transportador (Friggens *et al.*, 1998).

Se extrajeron muestras de sangre de cada animal de la vena yugular instantes antes del suministro de cada comida (dos horarios) durante el último día de cada período experimental. La sangre fue recogida en tubos que contenían heparina y posteriormente centrifugada a 3000 x g durante 15min. Con kits enzimáticos se cuantificaron los niveles de nitrógeno ureico y glucosa en el plasma sanguíneo (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina).

Los datos se analizaron según un diseño en Cuadrado Latino. Los tratamientos entre períodos se distribuyeron en forma aleatoria de manera tal que en cada período estaban presentes los tres tratamientos. A cada uno de los animales se les asignaron todos los tratamientos (T, P y U) en forma al azar en los diferentes períodos.

Los datos de consumo y de digestibilidad aparente total se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (1999) según el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + T_k + \epsilon_{ijkl},$$

donde:

Y_{ijkl} : variable observada,

μ : media general,

A_i : efecto del i-ésimo animal,

P_j : efecto del j-ésimo período,

T_k : efecto del k-ésimo tratamiento,

ϵ_{ijkl} : error experimental

Las medias de los tratamientos se compararon utilizando el test de Tukey-Kramer a un nivel de probabilidad del 5%.

Las variables pH, N-NH₃, AGV, uremia y glucemia se analizaron con el procedimiento MIXED de SAS (1999) utilizando el horario como una medida repetida en el tiempo. El modelo matemático empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_{i(k)} + P_j + T_k + \varepsilon 1_{(ijkl)} + H_m + (AH)_{im} + (PH)_{jm} + (HT)_{km} + \varepsilon 2_{(ijklm)}$$

donde:

Y_{ijkl} : variable observada,

μ : media general,

$A_{i(k)}$: efecto del i-ésimo animal anidado dentro del tratamiento

P_j : efecto del j-ésimo período,

T_k : efecto del k-ésimo tratamiento,

$\varepsilon 1_{(ijkl)}$: error adecuado para evaluar el efecto del tratamiento (APT)_{ijkl},

H_m : efecto del m-ésimo horario de muestreo (medida repetida),

$(AH)_{im}$: efectos del i-ésimo animal y del m-ésimo horario de muestreo,

$(PH)_{jm}$: efectos del j-ésimo período y del m-ésimo horario de muestreo,

$(HT)_{mk}$: efectos del m-ésimo horario de muestreo y del k-ésimo tratamiento,

$\varepsilon 2_{(ijklm)}$: error general, adecuado para evaluar los efectos $(AH)_{im}$, $(PH)_{jm}$ y $(HT)_{mk}$.

Las medias se compararon utilizando el test de Tukey-Kramer a un nivel de probabilidad del 5%.

5.3.- Resultados y discusión

En la Tabla 14 se presentan los valores de consumos promedios de cada una de las fracciones evaluadas en los diferentes tratamientos. Los consumos de MS expresados en kg/día o como porcentaje del peso vivo, no fueron diferentes ($P > 0,05$) entre los tratamientos (promedios de $8,34 \pm 0,16$ kg/animal/día y de $2,68 \pm 0,05$ % del PV, Tabla 14), indicando que en este ensayo los taninos no demostraron un efecto astringente para los bovinos. Además, la presencia de urea no generó ningún efecto de aversión en los animales. Russell *et al.* (1988) hallaron que la preservación de grano húmedo de sorgo con urea no afecta la aceptabilidad de novillos en terminación.

Tampoco se detectaron diferencias ($P>0,05$) entre tratamientos en los consumos de MO, almidón y PB, siendo los promedios de $8,02 \pm 0,05$, $4,53 \pm 0,03$ y $1,15 \pm 0,005$ kg/día, respectivamente (Tabla 14).

Tabla 14: Consumos promedios de cada una de las fracciones evaluadas en los diferentes tratamientos

Consumos	Tratamientos				
	T	U	P	EEM*	Valor P=
MS (kg/día)	8,42	8,15	8,43	0,16	0,53
Almidón (kg/día)	4,48	4,53	4,58	0,03	0,28
PB (kg/día)	1,15	1,14	1,15	0,005	0,63
MO (kg/día)	8,02	7,91	8,12	0,04	0,17
MS (% del peso vivo)	2,71	2,62	2,72	0,05	0,44

*EEM: error estándar de la media.

Los coeficientes de digestibilidad aparente de las fracciones MS, almidón y MO de las dietas fueron superiores en el tratamiento P, intermedias en el U e inferiores en el T (Tabla 15). La digestibilidad aparente de la dieta en los animales que consumieron el grano con PEG-4000 fue 61, 35 y 67% superior respecto a la dieta con grano no tratado para las fracciones MS, almidón y MO, respectivamente. Las diferencias en digestibilidad se redujeron con respecto a los animales que consumieron el grano no tratado, cuando se realizó el tratamiento con urea. Dichas diferencias fueron de 26, 14 y 36% para las fracciones MS, almidón y MO, respectivamente. No se hallaron diferencias ($P>0,05$) en la digestión de la PB entre los tratamientos P y U, que fueron en promedio un 63% superiores respecto al T (Tabla 15). Estos resultados confirman el hecho de que los taninos afectan negativamente la digestibilidad del grano de sorgo, y los tratamientos con PEG-4000 o urea resultan efectivos para reducir dicho efecto.

En granos de sorgo, la utilización del PEG-4000 para secuestrar taninos en granos secos ha aumentado la digestibilidad y la utilización neta del nitrógeno en 85 y 38%, respectivamente (Ford; Hewitt, 1979). En el presente ensayo, el tratamiento con PEG-4000 tuvo un efecto positivo sobre el grano aumentando las digestibilidades de la MO y la PB de la dieta en comparación con el tratamiento T, respectivamente (Tabla 15). Como sugieren Silanikove *et al.* (1996, 1997) parte de la mejora en la digestibilidad podría estar relacionada con un incremento en la fermentación ruminal y

parte con un incremento en la proporción y extensión del alimento digerido en el intestino. Ese incremento en la digestibilidad puede ser explicado por la liberación del complejo proteína-taninos por el tratamiento con PEG-4000 y el mantenimiento de la estabilidad del complejo PEG-taninos en todo el tracto digestivo (Silanikove *et al.*, 1994). En el caso particular del grano de sorgo, la mejora en la digestibilidad aparente de la proteína del grano con la incorporación de PEG-4000 presenta también un efecto positivo sobre la fracción de almidón. El almidón de este grano se encuentra rodeado por una matriz proteica (Rooney; Pflugfelder, 1986), que juega un papel importante en la tasa de hidrólisis del almidón. Un incremento en la degradación de la proteína favorece la accesibilidad a los gránulos de almidón y a su utilización por la microflora ruminal (Tabla 15). En granos húmedos de sorgo de alto contenido en tanino, Montiel *et al.* (2005), hallaron incremento en la desaparición *in situ* de las fracciones de almidón y de proteína al tratarlos con PEG-4000 y urea. Hill *et al.* (1991) obtuvieron, en animales que consumieron granos de sorgo tratados con 2% de urea, una menor excreción fecal de materia seca y almidón, indicando un mayor aprovechamiento de la fracción de almidón del grano.

La evolución del pH del líquido ruminal tuvo un comportamiento similar entre los tratamientos, siendo la interacción tratamiento x hora de muestreo no significativa ($P > 0,05$). Por esa razón, los valores que se presentan en la Tabla 15 corresponden a los valores promedios obtenidos a lo largo del día. El pH ruminal fue inferior en los tratamientos P y U respecto al tratamiento T (Tabla 15, $P < 0,05$) posiblemente a causa de la mayor digestibilidad del almidón. Las dietas con altos contenidos de granos de alta degradabilidad ruminal son rápidamente fermentadas en rumen, conduciendo a valores de pH relativamente bajos y a altas concentraciones de AGV en el fluido ruminal (Beauchemin *et al.*, 2001).

La concentración total de AGV fue superior en P e inferior en T ($P < 0,05$), mientras que el tratamiento U tendió a ser superior a T ($P = 0,07$, Tabla 15). La menor concentración de AGV totales en el tratamiento T puede ser explicada por el efecto negativo que generan los taninos sobre la fermentación microbiana. Al agregar taninos condensados de quebracho a granos de trigo y de maíz se logra disminuir la fermentabilidad *in vitro* disminuyendo la producción de AGV totales (Martinez *et al.*, 2006).

Las concentraciones molares de acético, butírico e iso-valérico no fueron modificadas por los tratamientos ($P > 0,05$, Tabla 15). La concentración de propiónico fue superior en P, intermedia en U e inferior en T. La mayor fermentabilidad de la

fracción almidonosa en las dietas de animales que consumieron el grano tratado con PEG-4000 o urea pudo haber incrementado la generación de propiónico. Producto de la mayor concentración de propiónico originado en las dietas con PEG-4000 y urea, la relación acético/propiónico fue más baja en estos tratamientos respecto al T ($P < 0,05$, Tabla 15).

La concentración de ácido iso-valérico no fue diferente entre los tratamientos ($P < 0,05$). Sin embargo, el ácido valérico fue superior en el tratamiento P ($P < 0,05$). Además, se halló una tendencia ($P = 0,08$) hacia una mayor concentración de valérico en los animales que consumieron el tratamiento U respecto al T (Tabla 15). La fermentación del aminoácido prolina es la responsable de la producción de valérico a nivel ruminal (El-Shazly, citado por Zavaleta de Lucio, 1976). El grano de sorgo es rico en proteínas del tipo de las prolaminas, las cuales constituyen entre el 70 y 80% de las proteínas totales (van Barneveld, 1999). Este tipo de proteínas contienen grandes cantidades de glutamina, leucina, alanina y principalmente prolina. Se ha demostrado que los taninos tienen una alta afinidad para unirse a las proteínas que tienen alto contenido de prolinas (Hagerman y Butler, 1981). Por consiguiente, la incorporación de PEG-4000 y urea podría mejorar la digestibilidad de dichas proteínas.

Los tratamientos con PEG-4000 o urea no modificaron las concentraciones de glucosa en el suero ($P > 0,05$, Tabla 15) de manera similar a lo hallado por Ben Salem *et al.* (2005 b). Sin embargo, dichas sustancias incrementaron las concentraciones de N-NH₃ a nivel ruminal y urea en el plasma sanguíneo ($P < 0,05$, Tabla 2). Esto puede atribuirse a la desactivación de los taninos por el PEG-4000 o la urea, causando un aumento en la fermentación de la proteína del grano por acción de los microorganismos ruminales. Los taninos condensados tienen una mayor afinidad a formar complejos con el PEG que con las proteínas (Landau *et al.*, 2000). Con la adición de PEG-4000 se espera que se produzca una liberación del complejo proteína-tanino (Hagerman; Butler, 1981), y por lo tanto un aumento en la digestibilidad aparente de la PB. Ben Salem *et al.* (2002) encontraron un aumento respecto al testigo en el nivel de urea en plasma de ovejas alimentadas con *A. cyanophylla* y suplementadas con PEG o con urea. Esto indicaría que ambas sustancias aumentan la digestibilidad aparente de la fracción proteica de la dieta actuando sobre los taninos presentes en el grano.

Tabla 15: Efecto de la adición de PEG-4000 o urea sobre la digestibilidad total aparente de la dieta y sobre los parámetros ruminales y plasmáticos.

Variables	Tratamientos ¹			Valor P	EEM*
	T	U	P		
Digestión total aparente					
Materia seca (%)	43,9 c	55,4 b	70,5 a	0,005	0,9
Almidón (%)	66,3 c	75,6 b	89,7 a	0,010	1,22
Proteína bruta (%)	33,1 b	49,13 a	58,8 a	0,025	2,08
Materia orgánica (%)	41,5 c	56,6 b	69,5 a	0,011	1,51
Ambiente ruminal					
pH	5,93 a	5,79 b	5,43 c	<0,0001	0,06
N-NH ₃ (mg/dl)	16,5 b	27,8 a	24,6 a	0,002	2,35
Acético (mol/100mol)	85,1	76,9	80,5	0,82	5,64
Butírico (mol/100mol)	14,0	14,7	14,3	0,99	2,53
Propiónico (mol/100mol)	39,1 c	47,7 b	57,3 a	0,02	4,33
Valérico (mol/100mol)	1,39 b	1,89 b	2,64 a	0,0001	0,24
Iso-valérico (mol/100mol)	3,47	4,19	3,58	0,51	0,52
AGV totales	138,9 b	146,5 b	157,9 a	<0,0001	4,14
Acético/Propiónico	2,29 a	1,60 b	1,58 b	<0,0001	0,18
Metabolitos plasmáticos					
Urea (mg/dl)	23,9 b	27,7 a	27,9 a	0,04	1,1
Glucosa (mg/dl)	75,9	79,9	80,0	0,37	2,39

¹ T: grano de sorgo ensilado; U: grano de sorgo ensilado con la adición de 2% de urea en base a la materia seca (MS) del grano; P: grano ensilado con la adición de 1g de PEG-4000/g de proteína bruta (PB) del grano.

Letras distintas en una misma fila indican diferencias entre dietas (P<0,05, Tukey-Kramer).

*EEM: error estándar de la media

Es necesario considerar que una fracción de la urea incorporada al grano en el tratamiento U estaría rápidamente disponible a nivel ruminal y pasaría rápidamente a sangre, produciendo una sobreestimación de la digestibilidad aparente de la PB. Esto generaría en consecuencia que dicha variable no sea un buen indicador de la medida en que la proteína dietaria es aprovechada por el bovino. Sin embargo, la mayor digestión del almidón en el tratamiento U respecto al T estaría indicando un aumento en la digestibilidad de la proteína que conforma la matriz que rodea a los gránulos de

almidón del grano, disminuyendo el efecto negativo de los taninos sobre dicha matriz proteica (Duodu *et al.*, 2003).

5.4.- Conclusiones

Los resultados del presente trabajo confirman que el mayor efecto antinutricional de los taninos en el grano de sorgo es la disminución de la disponibilidad de las proteínas y del almidón. De esta forma la incorporación, a granos húmedos de sorgos con alto contenido de taninos, de sustancias que capturen los taninos o impidan las uniones proteínas-taninos permite aumentar la digestibilidad total aparente de la dieta.

6. Capítulo 4

EFFECTO DEL PROCESO DE ENSILADO SOBRE LOS TANINOS Y LA TEXTURA DEL ENDOSPERMA. PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* Y RESPUESTA PRODUCTIVA DE TERNERAS ALIMENTADAS A CORRAL.

Experimentos 7 y 8.

6.1.- Introducción

La presencia de taninos y la textura del endosperma, juegan un rol importante sobre el aprovechamiento del grano de sorgo por parte del animal. Los taninos del sorgo no causan problemas de toxicidad en animales que los consumen, pero si disminuyen su eficiencia alimenticia dependiendo de la especie animal, el método de procesamiento del grano y del tipo de dieta (Hahn *et al.*, 1984). La eficiencia alimenticia (kg de alimento/ kg de ganancia de peso) puede ser mejorada entre un 10 a un 30% comparado con sorgos sin taninos; los animales generalmente consumen más alimento para producir las mismas o menores ganancias de peso (Hanh *et al.*, 1984; Rooney, 2005).

La textura del endosperma determina la dureza o vitrosidad del grano, existiendo una relación inversa con la degradación del almidón (Philippeau; Michalet-Doreau, 1997; Philippeau *et al.*, 1998). Un grano de sorgo seco vítreo tiene una digestibilidad *in situ* un 34% menor respecto a uno harinoso (Miller *et al.*, 1972). La textura del endosperma, puede causar variaciones en la digestión del almidón a nivel ruminal, variando entre un 48 a 80% de acuerdo a si el grano tiene textura córnea o harinosa, respectivamente (Samford *et al.*, citado por Waldo, 1973). Hibberd *et al.* (1982b) evaluaron de almidones, extraídos de la matriz proteica, de genotipos de sorgo normales y waxy, que diferían en la textura del endosperma y en el contenido de taninos, sin hallar diferencias en la producción de gas *in vitro* de los mismos. Dichos autores sugirieron que otros factores distintos al tipo de almidón, por ejemplo las proteínas (relacionadas con la textura) o los taninos, pueden limitar la disponibilidad de almidón y por lo tanto disminuir la digestibilidad del grano de sorgo cuando se suministra a los bovinos. Si bien existen evidencias que la textura del endosperma y el contenido de taninos afectan la digestión del grano y por lo tanto la performance animal, no se conoce cual sería su efecto en forma conjunta sobre granos cosechados con alto contenido de humedad y ensilados sobre la respuesta animal.

El almacenamiento del grano de sorgo, alto en taninos, con alto contenido de humedad y bajo condiciones de anaerobiosis puede modificar la cantidad de taninos extractables (Cummins, 1971; Reichert *et al.*, 1980; Mitaru *et al.*, 1983, 1984 b y c). Jansman (1993) indica que la fermentación anaeróbica podría modificar la estructura y reactividad de los taninos, lo cual los hace menos extractables. Lo que se desconoce es si durante el proceso de ensilado se produce solo una disminución de la cantidad de taninos o también una modificación de la actividad inhibitoria de los mismos. Además, sería importante conocer si durante el proceso de ensilado se produce alguna modificación del endosperma en genotipos contrastantes en la textura (vítreo y harinoso).

El siguiente capítulo comprende dos experimentos, en el primero se estimaron los efectos del proceso de ensilado sobre el endosperma de granos contrastantes en la textura y sobre la actividad de los taninos condensados, evaluándose los mismos a través de la técnica de producción de gas *in vitro*. En el segundo experimento se evaluaron la utilización de granos húmedos de sorgos contrastantes en la textura del endosperma y en la concentración de taninos sobre la respuesta productiva de terneras engordadas a corral.

6.2.- Materiales y métodos.

6.2.1.- Materiales experimentales, implantación del cultivo y confección de los silajes.

Los híbridos que constituyeron los materiales experimentales a evaluar fueron los siguientes: ACA 559 (ATV: híbrido alto tanino con endosperma vítreo, ACA ®), ACA 558 (ATH: híbrido alto tanino con endosperma harinoso, ACA ®), ProINTA Blanco (Blanco, sorgo sin testa pigmentada, sin taninos).

Los sorgos fueron sembrados en un predio de la Reserva 7 de la EEA INTA Balcarce, sobre un suelo Argiudol típico de 1,5 m de profundidad efectiva. La siembra se realizó a 65 cm entre hilera y a una densidad de 9 kg de semilla/ha, y por cada uno de los genotipos se sembró una extensión de 5 has. Previo a la siembra se realizó una aplicación en forma conjunta de 3,5 l de glifosato, 2 l de atrazina y 2 l de acetoclor. Al momento de la siembra se realizó una fertilización con 120 kg/ha de fosfato di-amónico y cuando el cultivo tuvo cuatro hojas expandidas se aplicaron 100kg/ha de urea.

Cuando los granos alcanzaron el 35% de humedad fueron cosechados, molidos con los rodillos de la máquina embudidora de granos. Posteriormente, fueron embutidos en una bolsa, de 5 pies de diámetro, para su correcta conservación, realizando un compactado de los mismos con el objeto de generar una ambiente anaeróbico.

El mismo día que se cosecharon las parcelas se tomaron muestras de grano entero y se confeccionaron por cada unos de los genotipos seis microsilajes en recipientes de PVC similares a los indicados en el capítulo 1. A tres de ellos se les aseguraron las condiciones de anaerobiosis extrayéndose el oxígeno mediante una bomba de vacío para que se produzca el proceso de ensilado y una correcta conservación. Los mismos fueron mantenidos a temperatura ambiente dentro de un galpón hasta el momento de su utilización. Los tres recipientes restantes fueron almacenados a -18°C en aerobiosis (no ensilado) para evitar el desarrollo de microorganismos indeseables. Ambos materiales fueron los que se emplearon posteriormente en los experimentos de producción de gas *in vitro*.

6.2.2.- Análisis de calidad de los silajes

Al momento de la apertura de los silajes se tomaron muestras representativas de cada uno de los granos para realizar los siguientes análisis químico-biológicos:

- a) materia seca (MS, AOAC, 1995)
- b) materia orgánica (MO, AOAC, 1995)
- c) almidón (ALM, AOAC, 1995)
- d) digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS, usando el sistema de incubación Daisy II (Ankom Technology, Macedon, NY)
- e) pH (Baron *et. al.*, 1986)
- f) NH₃/N total (Chaney y Marbach, 1962)
- g) taninos por el método de Folin-Denis (Magalhães *et al.*, 1997). Esta determinación fue realizada en el Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral. Esta determinación se realizó sobre los granos ensilado y los almacenados a -18°C utilizados en los experimentos de producción de gas *in vitro*.

h) proteína bruta (PB, mediante combustión total de la muestra en atmósfera de oxígeno ultrapuro en un equipo LECO FP528; posteriormente se multiplica el valor obtenido de la combustión (N) por el factor 6,25, Horneck y Miller, 1998).

6.2.3.- Ensayos de producción de gas *in vitro* (Experimento 7).

6.2.3.1.- Tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico.

El experimento de producción de gas *in vitro* se dividió en dos partes, en la primera se estudio el efecto del proceso de ensilado sobre la fracción endosperma de los granos y en la segunda se evaluó la actividad de los taninos provenientes de pericarpios de granos ensilados y no ensilados.

Los granos almacenados de las dos maneras propuestas anteriormente (ensilado y no ensilado) fueron secados en estufa. Posteriormente se determino, la proporción de tegumentos y de endosperma más embrión, en cada uno de los genotipos y en ambos tipos de almacenamientos (ensilado y no ensilado) de acuerdo a lo propuesto por Reichert *et al.* (1989). Los granos fueron remojados en agua destilada durante 10 minutos y posteriormente secados con papel secante. Utilizando un bisturí y una pinza, se seccionaron los tegumentos (pericarpio y testa) y fueron separados del endosperma y el embrión bajo la imagen de una lupa. Ambos componentes (pericarpio + testa y endosperma + embrión) fueron secados por separados y posteriormente pesados para determinar la proporción de cada uno de ellos. Esto se realizó sobre 50 granos de cada uno de los genotipos.

Otra muestra de granos enteros de cada uno de los genotipos (ensilados y no ensilados) fueron decortcados en forma mecánica con un molino pulidor de arroz marca SATAKE®. Dicho molino separa por escarificado mecánico el tegumento, dejando en otro compartimento el endosperma y el embrión enteros. El pulido o decortcado de los granos se realizó en la EEA INTA Concepción del Uruguay, y el molino experimental fue facilitado por el Grupo de mejoramiento genético de arroz. Una vez obtenida ambas fracciones de los granos, las mismas fueron molidas por separado en un molino tipo Willey con malla de 1 mm, obteniéndose el material que posteriormente se utilizó en la determinación de la producción de gas *in vitro*.

Para evaluar el efecto del proceso de ensilado sobre la producción de gas *in vitro* de endospermas provenientes de diferentes híbridos se generaron 6 tratamientos producto de la combinación de los híbridos (ATV, ATH y Blanco) y el tipo de almacenamiento (ensilado y no ensilado). Cabe aclarar que en esta parte del ensayo solo se incubó la fracción endosperma y embrión (sin tegumentos) de los diferentes híbridos sometidos al proceso de ensilado o no. Por cada uno de los tratamientos se confeccionaron tres frascos y se realizaron tres corridas diferentes. Los parámetros obtenidos de la producción de gas fueron analizados en un DBCA con un arreglo factorial (híbridos y tipo de almacenamiento) utilizando la corrida como factor de bloqueo y bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + H_i + A_j + (HA)_{ij} + C_k + \varepsilon_{ijkl},$$

donde:

Y_{ijkl} : variable observada,

μ : media general,

H_i : efecto del i-ésimo híbrido,

A_j : efecto del j-ésimo tipo de almacenamiento,

$(HA)_{ij}$: efecto de la interacción entre el híbrido y el tipo de procesamiento,

C_k : efecto del i-ésimo bloque (corridas, $k=3$),

ε_{ijkl} : error experimental.

El efecto del proceso de ensilado sobre la actividad inhibitoria de los taninos fue evaluado de la siguiente manera: al endosperma de los granos ensilados de cada híbrido se le agregó diferentes proporciones de taninos: 0, 50, 100 y 150% de la concentración de taninos presente en el pericarpio del grano ensilado. Los taninos provenían de su mismo pericarpio de los granos ensilados y no ensilados, sobre los cuales se había determinado previamente la concentración de taninos para calcular las dosis. De esta manera, los tratamientos se originaron por la combinación del tipo de almacenamiento (pericarpios de los granos ensilados y no ensilados) y las diferentes proporciones de taninos. Por cada uno de los tratamientos se confeccionaron tres frascos y se realizaron tres corridas diferentes. Los parámetros se analizaron en un DBCA utilizando la corrida como factor de bloqueo y anidando dentro de cada híbrido el arreglo factorial tipo de almacenamiento y proporciones de taninos bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + H_h + A_{i(h)} + P_{j(h)} + (AP)_{ij(h)} + C_k + \varepsilon_{ijkl},$$

donde:

Y_{ijkl} : variable observada,

μ : media general,

H_h : efecto del h-ésimo híbrido,

$A_{i(h)}$: efecto del i-ésimo tipo de almacenamiento anidado dentro de cada híbrido,

$P_{j(h)}$: efecto de la j-ésima proporción de taninos anidada dentro de cada híbrido,

$(AP)_{ij(h)}$: efecto de la interacción entre el tipo de almacenamiento y la proporción de taninos anidada dentro de cada híbrido,

C_k : efecto del i-ésimo bloque (corridas, $k=3$),

ε_{ijkl} : error experimental.

Los análisis se realizaron con el procedimiento GLM (General Linear Models) de SAS (2009) y las medias se compararon con el test de Tukey-Kramer. Se consideraron diferencias entre tratamientos estadísticamente significativas, y no significativas cuando la probabilidad del error fue menor o mayor al 5%, respectivamente.

6.2.3.2. Determinación de la producción de gas *in vitro*.

Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* propuesta por Mauricio *et al.* (1999), la cual mide la presión de gas generada por la fermentación de un sustrato incubado con una solución que consta de líquido ruminal de un animal donante. Se usaron frascos de vidrio de 125 ml, en los cuales se colocaron 0,3 g de material correspondiente a cada tratamiento. Por cada tratamiento se pesaron tres botellas que fueron posteriormente inoculadas con un preparado que contenían líquido ruminal. Cada uno de los frascos fue cerrado herméticamente con un tapón de goma y un precinto de aluminio para asegurarse el completo almacenamiento dentro del frasco del gas generado.

El inóculo fue preparado con fluido ruminal, una solución buffer, agua destilada y una solución con sulfato de amonio. La solución buffer contiene por cada litro: 46,5 g de Na_2SO_4 ($12\text{H}_2\text{O}$), 49 g de NaHCO_4 , 2,35 g de NaCl , 2,85 g de KCl , 0,64 g de MgCl

y 0,2 g de CaCl_2 . La solución final, producto de la mezcla del agua más la solución buffer y la solución de sulfato de amonio fue gaseada con CO_2 hasta alcanzar un pH entre 6,7 y 6,8, y se dosificaron 40 ml dentro de cada botella el día anterior. Antes de iniciarse la incubación, las botellas se colocaron en un baño de agua a 39°C una hora antes de inocularse con el líquido ruminal.

El líquido ruminal fue extraído de una vaca donante de raza Aberdeen Angus de 435 kg, provista de una cánula ruminal de 11 cm de diámetro. La dieta de dicho animal estuvo compuesta por 4 kg de heno de gramíneas, 4 kg de heno de alfalfa, 2 kg de grano de maíz molido y 1 kg de harina de girasol. Una vez extraído el fluido ruminal, fue almacenado en un recipiente térmico, posteriormente filtrado con dos capas de gasa y mantenido a 39°C con un gaseado constante con CO_2 . Cada frasco fue inoculado con 10 ml de líquido ruminal y, previo a ser sellados herméticamente con tapón y precinto de aluminio, fueron gaseados con CO_2 para mantener la anaerobiosis. Durante todo el período de incubación los frascos permanecieron suspendidos en un baño de agua a 39°C .

La producción de gas fue estimada a través de mediciones sucesivas de presión acumulada utilizando un manómetro digital manual PSI-TRONIX® provisto de una aguja de 0,8 x 25 mm. Al principio de cada medición el contenido de los frascos fue homogeneizado por agitación manual para expulsar todas las burbujas de gas que pudieran quedar atrapadas en el líquido. Luego de cada medición se dejaba unos instantes la aguja, con el objeto de liberar todo el gas para igualar la presión del interior del frasco en la del ambiente. Esto tiene como objeto evitar que la presión acumulada en el interior del frasco sea excesiva y produzca algún efecto negativo sobre el crecimiento de la población bacteriana.

Los valores de presión obtenidos en cada horario fueron corregidos para la cantidad de MO incubada y restándoles también la presión generada por el blanco o control negativo (frascos que contenían solo líquido ruminal sin sustrato) en dicho horario. Los datos de presión fueron transformados en volumen de gas, y para ello, los valores corregidos de presión (restando los blancos) fueron multiplicados por el factor 4,7. Dicho factor fue obtenido experimentalmente y relaciona la variación del volumen con respecto a la presión.

Los datos de producción de gas obtenidos se ajustaron mediante el procedimiento NLIN de SAS (2009) al modelo propuesto por France *et al.* (1993):

$$y = A [1 - \exp^{(-b(t-L)-c(\sqrt{t-L}))}]$$

en donde:

y, representa la producción total de gas al tiempo de incubación t,

A, es la producción potencial de gas (mL)

b, describe la tasa fraccional de producción de gas (mL/h)

c, es la tasa constante de producción de gas ($h^{-1/2}$)

L, representa el periodo de latencia antes que la producción de gas se inicie (fase de retraso ó Lag time).

A partir de los datos anteriores se calculó el tiempo para alcanzar la mitad de la asíntota (T/2, h) y también el ritmo de producción de gas (μ a T/2, /h) en ese punto:

$$T/2 = \{[-d/2 + \sqrt{(d^2/4 + c(cL + d\sqrt{L} - \ln(1/2)))}]/c\}^2$$

$$\mu = c + (d/2\sqrt{T/2})$$

La producción de gas fue estimada a través de mediciones sucesivas de presión acumulada utilizando un manómetro digital a la 1, 2, 3, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de iniciada la incubación. Los tratamientos fueron incubados por triplicados (tres botellas) en tres corridas sucesivas.

6.2.4.- Ensayo de engorde a corral (Experimento 8).

6.2.4.1.- Sitio experimental, animales, tratamientos y diseño experimental.

En ensayo de la respuesta productiva de terneras engordadas a corral, se realizó en los corrales de la Reserva 7 de la EEA INTA Balcarce. Para ello se utilizaron 45 terneras de raza Aberdeen Angus de 188 ± 12 kg de peso vivo promedio y de tamaño corporal adulto 3 (BIP, 2010), las cuales fueron asignadas al azar a cada uno de los tratamientos.

Las terneras fueron distribuidas en 9 corrales de cinco animales cada uno, de acuerdo a los tratamientos, obteniéndose de esta manera tres repeticiones por

tratamientos (tres corrales por tratamiento). El diseño experimental utilizado fue un completamente aleatorizado con tres tratamientos y tres repeticiones (corrales).

Los tratamientos se generaron con el objeto de evaluar los tres genotipos de sorgos, que difieren en la textura del endosperma y el contenido de taninos, como principal componente en dietas de engorde a corral. De acuerdo a esto quedaron conformados los siguientes tratamientos:

ATV: 70 % de la dieta (base seca) con grano de sorgo alto en taninos y de endosperma vítreo (ACA 559®).

ATH: 70% de la dieta con grano (base seca) de sorgo alto en taninos y de endosperma harinoso (ACA 558®).

Blanco: 70% de la dieta con grano (base seca) de sorgo blanco sin taninos (ProINTA Blanco®).

El resto de la dieta estuvo compuesto por 12% de silaje de maíz, 17% de harina de girasol y 1% de una premezcla vitamínico mineral. Dicha premezcla contenía en base a materia seca 76,9% de conchilla, 5,6% de sal, 14,6% de núcleo vitamínico mineral, 2% de Rumensin® y 0,9% de urea. Los animales fueron alimentados *ad libitum* durante 56 días (sin incluir los 20 días de acostumbramiento), asegurando un 5% de rechazo, en una entrega diaria por la mañana. Durante el período de acostumbramiento los animales comenzaron a comer una dieta con 50% de silaje de maíz, 30% de grano húmedo de sorgo y 20% de harina de girasol. El porcentaje de silaje de maíz fue disminuyendo gradualmente hasta reemplazarlo por el correspondiente nivel de grano húmedo de sorgo.

6.2.4.2.- Mediciones y muestreos

Sobre los animales se evaluaron las siguientes variables:

1.- Peso vivo (kg): el peso vivo inicial y final se determinó en forma individual durante dos días consecutivos para minimizar el efecto de llenado. Además, durante el ensayo se realizaron pesadas individuales cada 14 días hasta la finalización del período de engorde con el objeto de controlar el aumento de peso de los animales.

2.- Consumo de materia seca (CMS, kg/día): el consumo de la dieta se midió semanalmente durante tres días consecutivos por semana, por diferencia entre el peso ofrecido y el rechazado.

3.- Espesor de grasa dorsal: cada 28 días se determinó mediante ultrasonografía *in vivo* el espesor de la grasa subcutánea de cada animal en la zona de proyección del espacio intercostal de la 12^o y 13^o costilla izquierda. Al igual que con la determinación del peso vivo, los espesores de grasa subcutánea inicial y final fueron determinados durante dos días consecutivos.

A partir del peso vivo inicial y final, y del consumo diario de materia seca se estimaron el aumento diario de peso vivo (ADPV, kg/día) y la eficiencia de conversión del alimento (EC, kg ADPV/kg CMS).

Sobre cada uno de los componentes de la dieta se extrajeron muestras semanalmente y se realizaron los siguientes análisis químico-biológicos:

- a) materia seca (MS, AOAC, 1995)
- b) materia orgánica (MO, AOAC, 1995)
- c) almidón en los silajes (ALM, AOAC, 1995)
- d) digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS, usando el sistema de incubación Daisy II (Ankom Technology, Macedon, NY))
- e) pH en los silajes (Baron *et al.*, 1986)
- f) NH₃/N total en los silajes (Chaney y Marbach, 1962)
- g) taninos en los granos de sorgo por el método de Folin-Denis (Magalhães *et al.*, 1997). Esta determinación fue realizada en el Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral.
- h) proteína bruta (PB, mediante combustión total de la muestra en atmósfera de oxígeno ultrapuro en un equipo LECO FP528; posteriormente se multiplica el valor obtenido de la combustión (N) por el factor 6,25, Horneck y Miller, 1998).

6.2.4.3.- Análisis estadístico de los datos.

Los análisis de los datos de consumo, ganancia de peso, eficiencia de conversión y espesor de grasa dorsal se realizaron utilizando el procedimiento GLM (General Linear Models) de SAS (2009) y las medias se compararon con el test de Tukey-Kramer. Debido a que el espesor de grasa inicial resultó diferente ($P < 0,05$)

entre los tratamientos, se utilizó como covariable para corregir la tasa de engrasamiento. Se consideraron diferencias entre tratamientos estadísticamente significativas, y no significativas cuando la probabilidad del error fue menor o mayor al 5%, respectivamente.

6.3.- Resultados y discusión.

6.3.1.- Ensayos de producción de gas *in vitro* (Experimento 7)

Los parámetros obtenidos a partir de la fermentación de los endospermas de los diferentes híbridos sometidos a diferentes tipos de almacenamientos (ensilado y no ensilado) se presentan en la Tabla 16. El tipo de almacenamiento y los híbridos no tuvieron efectos ($P > 0.05$) sobre la producción de gas potencial predicha por el modelo (A, ml) y el tiempo de retardo (L, h) en comenzar la fermentación del endosperma, a su vez la interacción entre dichos factores no fue significativa ($P > 0,05$), razón por la cual se presentan los valores promedios en la Tabla 16.

Tabla 16: Producción de gas potencial y tiempo de retardo de los endospermas de diferentes híbridos y tipos de almacenamientos.

Factores	Item	A (ml)	L (h)
Híbridos	Blanco	252,7	1,90
	ATH	257,2	1,87
	ATV	254,3	1,77
	EEM	3,57	0,081
	Valor P=	0,661	0,489
Tipos de almacenamiento	Ensilado	251,5	1,82
	No ensilado	257,9	1,87
	EEM	2,92	0,066
	Valor P=	0,127	0,619

A: producción de gas potencial

L: tiempo de retardo o lag

ATH: alto tanino harinoso

ATV: alto tanino vítreo

EEM: error estándar de la media

Debido a que los taninos están presentes principalmente en la testa y también en el pericarpio (Reichert *et al.*, 1980), el proceso de decorticado remueve dichas

sustancias de los granos. Por esa razón, el efecto de los taninos no fue evidente entre los híbridos tanto en la producción de gas *in vitro* como en el tiempo de retardo o lag (Tabla 16) dado que no estuvieron presentes porque se incubó solo la fracción endosperma.

Un grano con una mayor proporción de endosperma harinoso alcanza una mayor digestibilidad respecto a uno con mayor proporción de endosperma vítreo (Miller *et al.*, 1972; Samford *et al.*, citado por Waldo, 1973). Además, Hibberd *et al.* (1982a, 1985) indicaron que los granos más vítreos presentan una menor disponibilidad del almidón, reflejada en una menor cantidad y tasa de producción de gas *in vitro* respecto de los harinosos. Kotarski *et al.* (1992) demostraron una mayor tasa de desaparición *in vitro* del almidón en líneas de sorgo con endosperma harinoso respecto a líneas con endosperma vítreo. A pesar de ello, esta tendencia no se reflejó en este experimento, ya que no se hallaron diferencias en la producción de gas y el tiempo necesario para iniciar la fermentación entre los genotipos ATV y ATH (Tabla 16). Cabe aclarar que en todos los trabajos citados anteriormente, a diferencia de lo propuesto en este experimento, se evaluaron granos cosechados con 14 % de humedad, es decir en el estado de madurez de cosecha, mientras que en este trabajo se usaron granos cosechados en la madurez fisiológica.

Existen evidencias que indican que la matriz proteica no estaría completamente endurecida y se encontraría expandida cuando el grano se encuentra en la madurez fisiológica (Sullins; Rooney, 1971). Esto podría provocar que los gránulos de almidón sean más susceptibles para ser atacados y fermentados por las bacterias ruminales, y por lo tanto no se presenten las diferencias que pueden ser ocasionadas por la textura más vítrea o harinosa, tal como se observó en este ensayo. Por esa razón, las diferencias entre genotipos, por ejemplo en la textura del endosperma, pueden ser minimizadas o anuladas ensilando el grano húmedo en el momento de la madurez fisiológica.

El tiempo medio en el cual se alcanza la mitad de la producción de gas ($T/2$, h) y la tasa de producción de gas en ese punto (μ a $T/2$, /h), dependieron del híbrido y del tipo de almacenamiento en forma conjunta, siendo las interacciones entre dichos factores significativas ($P < 0,05$). El proceso de ensilado solo modificó dichos parámetros en el endosperma del sorgo blanco ensilado, aumentando la tasa de producción de gas y por consiguiente disminuyendo el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la fermentación total ($P < 0,05$, Tabla 17). En los híbridos con alto contenido

de en taninos y con diferentes texturas de endosperma el proceso de ensilado no afectó ninguno de los parámetros evaluados (Tabla 17).

Durante el proceso de ensilado del grano cosechado húmedo puede producirse una serie de alteraciones en la estructura y composición química del grano, producto de la actividad de los microorganismos presentes. Riggs (citado por Ware *et al.*, 1977) sugiere que el ensilado puede provocar la ruptura de la matriz proteica causando un incremento en la solubilidad del nitrógeno y permitiendo que la enzimas hidrolicen las moléculas de almidón. Ware *et al.* (1977) hallaron, en un grano de sorgo bajo en taninos ensilado, una mayor producción de nitrógeno amoniacal respecto al mismo grano no ensilado, sin modificarse la cantidad de proteína bruta. Esto indicaría que durante el proceso de ensilado puede existir una hidrólisis de la proteína presente en la matriz que rodea los gránulos de almidón, y por lo tanto aumenta su fermentabilidad. A pesar de ello, dicho efecto es dependiente de la concentración de taninos, ya que únicamente se presentó en el genotipo sin taninos (Tabla 17).

Tabla 17: Tiempo a la mitad de la producción de gas y la tasa en ese punto de los endospermas de los diferentes híbridos y almacenamientos.

Parámetros	Tipo de almacenamiento	Híbridos		
		Blanco	ATH	ATV
T/2 (h)	Ensilado	6,82	7,86	7,70
	No ensilado	7,78	7,85	7,87
	EEM	0,118	0,118	0,118
	Valor P=	<0,0001	0,94	0,28
μ a T/2 (/h)	Ensilado	0,18	0,146	0,138
	No ensilado	0,14	0,148	0,143
	EEM	0,007	0,007	0,007
	Valor P=	0,0004	0,83	0,59

T/2: tiempo transcurrido hasta que se alcanza la mitad de la producción de gas total.

μ a T/2: tasa en el punto en el que se alcanza la mitad de la producción de gas total.

ATH: alto tanino harinoso

ATV: alto tanino vítreo

EEM: error estándar de la media

Si se comparan la generación de nitrógeno amoniacal producida por los diferentes híbridos ensilados durante el proceso de ensilado, se observa que el grano

blanco ensilado produjo en promedio un 77% más de nitrógeno ($P < 0,05$) respecto a los otros dos híbridos altos en taninos (4,62, 2,59 y 2,62 % $N-NH_3/NT$ para los híbridos Blanco, ATH y ATV, respectivamente). Cabe aclarar, que a pesar de ello los valores de PB de los silajes no fueron diferentes ($P > 0,05$) entre los híbridos, y alcanzaron en promedio un 7,04%. Durante el proceso de ensilado los granos se encontraban completos, ya que el decorticado se realizó posteriormente al mismo, por lo cual, la presencia de taninos en los genotipos ATV y ATH posiblemente ocasionó una inhibición en la actividad de los microorganismos presentes en el silaje, y por lo tanto una disminución en la degradación de la proteína, indicada por una menor producción de $N-NH_3/NT$ en dichos silajes. La presencia de los taninos disminuye la disponibilidad de la PB debido a la formación del complejo proteína-taninos y a la inhibición de las enzimas proteolíticas de las bacterias (Albrecht; Muck, 1991 y Gonçalves *et al.*, 1999), lo cual explicaría la menor producción de $N-NH_3/NT$ en los ensilajes de los genotipos altos en taninos.

El efecto del proceso de ensilado sobre la concentración y actividad de los taninos se evaluó también mediante la producción de gas *in vitro* en la segunda parte del ensayo. En la Tabla 18 se presenta el efecto del proceso de ensilado sobre la concentración de taninos en el grano. En los sorgos altos en taninos hubo una significativa ($P < 0,05$) disminución en la concentración de taninos luego de ser sometidos a un proceso de ensilado, y la misma fue del 46,6 y 50,1% para los híbridos ATV y ATH, respectivamente. Esto fue coincidente con lo hallado en el experimento 2 (Capítulo 1), donde se obtuvo una reducción del 57% en la concentración de taninos luego del proceso de ensilado. La disminución del contenido de taninos luego del proceso de ensilado ha sido indicada por varios autores (Cummins, 1971; Mitaru *et al.*, 1984 a y b; Osman, 2004) y discutida en el Capítulo 1. La reducción en el nivel de taninos obtenida con estos híbridos estuvo en el orden de lo hallado por Cummins (1971) quien indicó disminuciones de aproximadamente un 50%. Myer *et al.* (1986) y Osman (2004), hallaron menores niveles de reducción en el nivel de taninos, luego de un proceso fermentativo, indicaron valores máximos de hasta un 30%. Posiblemente la diferencia se deba a que los granos con los que trabajaron hayan tenido menores concentraciones de taninos iniciales.

Tabla 18: Efecto del proceso de ensilado sobre la concentración de los taninos de diferentes híbridos de sorgo.

Tipo de almacenamiento	Concentración de taninos ¹		
	Blanco	ATV	ATH
Ensilado	38,7	195,1	202,9
No ensilado	34,2	365,6	406,87
EEM	10,6	10,6	10,6
Valor P=	0,9996	<0,0001	<0,0001

¹: mg eq. de ácido tánico / 100 g de muestra, base materia seca (Método de Folin Denis).

Los polifenoles detectados en el híbrido Blanco (sorgo que no presenta una testa pigmentada, Tabla 18) se deben principalmente a un error en el método que lo determina. El método de Folin-Denis es del tipo colorimétrico que cuantifica grupos fenólicos totales, basándose en reacciones de oxidación-reducción (Schofield *et al.*, 2001). Al determinar fenoles totales, otros compuestos que no son taninos condensados, como serían los ácidos fenólicos y los flavonoides, pueden dar reacciones positivas con el reactivo de Folin-Denis, razón por la cual en el híbrido Blanco se obtuvieron valores en promedio de 36 mg de ácido tánico/100 g de muestra. A pesar de ello, si bien este protocolo no discrimina ácidos fenólicos y flavonoides de taninos condensados, puede ser usado en el grano de sorgo, debido a que el mismo posee en su composición química solo pequeñas cantidades de otros compuestos que no sean taninos (Hahn *et al.*, 1984; Magalhães *et al.*, 1997).

Respecto a los parámetros que caracterizan la producción de gas *in vitro*, en el híbrido Blanco, no se hallaron efectos ($P > 0,05$) debidos al tipo de almacenamiento ni a las proporciones de pericarpios agregadas sobre los parámetros estimados, y los valores promedios fueron de 277,6 ml, 1,91 h, 6,09 h y 0,164/h para A, L, T/2 y μ a T/2, respectivamente. Esto indica que la producción de gas de un sorgo sin taninos, como el híbrido Blanco, no se ve afectada por las proporciones en la que se agrega el pericarpio ni por el tipo de almacenamiento al que se vio sometido este último previo al decorticado. Esto está explicado principalmente porque dicho genotipo no presenta taninos condensados en el grano que afectarían su producción de gas *in vitro* y por lo tanto su digestión. Similares resultados fueron hallados por Riffel (2007) quien no halló diferencias en la producción de gas de un sorgo bajo en taninos, comparando la incubación de un grano completo y el mismo pero decorticado.

El tipo de almacenamiento tampoco tuvo efecto ($P>0,05$) sobre los parámetros en los híbridos altos en taninos, y los valores promedios entre ensilado y no ensilado fueron de 239,3 ml, 2,14 h, 7,79 h y 0,126/h y 237 ml, 2,11h, 7,41 h y 0,136/h para A, L, T/2 y μ a T/2 de los híbridos ATH y ATV, respectivamente.

A diferencia de lo anterior, los parámetros que caracterizan la producción de gas *in vitro*, si fueron modificados por el agregado de taninos (Tabla 19). El incremento en las cantidades de taninos agregadas produjo una disminución ($P<0,05$) de los volúmenes totales de gas producidos (A) y las tasas de producción de gas en el tiempo de alcanzada la mitad de la fermentación (μ a T/2) en ambos híbridos altos en taninos (Tabla 19). De forma contraria, el aumento en la cantidad de taninos también incrementó el tiempo de retardo en iniciarse la fermentación (L) y el tiempo necesario en alcanzar la mitad de la asíntota (T/2) (Tabla 19).

Tabla 19: Efecto del agregado de diferentes proporciones de taninos sobre los parámetros de producción de gas *in vitro* de los granos alto taninos con diferentes texturas de endosperma.

		Proporciones de taninos (%)					
Parámetros		0	50	100	150	Valor P	E.E.M.
ATH	A (ml)	271,6 a	253,1 b	225,7 c	206,7 d	<0,0001	2,77
	L (h)	1,91 a	2,13 b	2,21 c	2,33 d	<0,0001	0,021
	T/2 (h)	6,09 a	7,19 b	8,16 c	9,73 d	<0,0001	0,095
	μ a T/2 (/h)	0,163 a	0,133 b	0,113 c	0,092 d	<0,0001	0,0018
ATV	A (ml)	280,6 a	259,3 b	222,1 c	185,9 d	<0,0001	4,94
	L (h)	1,76 a	2,01 b	2,29 c	2,38 d	<0,0001	0,021
	T/2 (h)	5,66 a	6,40 b	7,80 c	9,77 d	<0,0001	0,162
	μ a T/2 (/h)	0,174 a	0,154 b	0,123 c	0,093 d	<0,0001	0,0033

Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas. Test de Tukey-Kramer ($P<0,05$).

A: producción de gas potencial

L: tiempo de retardo o lag

T/2: tiempo transcurrido hasta que se alcanza la mitad de la producción de gas total.

μ a T/2: tasa en el punto en el que se alcanza la mitad de la producción de gas total.

E.E.M.: error estándar de la media.

Varios tratamientos han sido propuestos para reducir el contenido de taninos y aumentar su valor biológico en el grano de sorgo, entre ellos se puede citar el decortinado del mismo (Chibber *et al.*, 1978; Chibber *et al.*, 1980). En este trabajo, cuando se incubaron los granos alto en taninos sin pericarpio se obtuvieron los

mayores niveles de producción de gas *in vitro* y por lo tanto la mayor fermentación (Tabla 19).

Hibberd *et al.* (1982a) y Streeter *et al.* (1990a) encontraron que la producción de gas *in vitro* de variedades de sorgos resistentes a pájaros fue mas baja respecto a híbridos normales, lo cual estuvo asociado al contenido de taninos presentes en los híbridos antipájaros. Opatpatanakit *et al.* (1994) también indicaron que la presencia de taninos en el grano afecta la producción de gas *in vitro* del sorgo. Las menores producciones potenciales de gas *in vitro* y menores degradabilidades *in vitro* se obtuvieron en los híbridos de sorgos denominados como resistentes a pájaros y con mayores contenidos de taninos (Cabral Filho, 2004). A su vez, dicho autor también hallo un mayor tiempo de colonización estimado o lag time en un híbrido con alta concentración de taninos (Cabral Filho, 2004). Por su parte, Pires (2007) concluyó que la reducción en el tiempo de colonización de la bacterias al sustrato en silajes de sorgos está favorecido por la presencia de sustancias rápidamente fermentable y la ausencia de factores antinutricionales como los taninos condensados.

Los cultivos discontinuos de microorganismos ruminales en combinación con la técnica de producción de gas *in vitro* son sistemas cerrados que resultan confiables para detectar compuestos capaces de inhibir la fermentación ruminal (Khazaal *et al.*, 1994). En varias ocasiones, ha sido observado que los taninos reducen tanto el ritmo como la extensión de la producción de gas (Getachew *et al.*, 2000; Frutos *et al.*, 2004; Reina *et al.*, 2007). Esto probablemente se deba a un detrimento en la adhesión microbiana a las partículas del alimento (McAllister *et al.*, 1994) y/o a una inhibición del crecimiento y de la actividad enzimáticas de la microflora ruminal (McSweeney *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005).

En este ensayo, tal como puede apreciarse en las figuras 11 y 12, las tasas de fermentación de los genotipos ATH y ATV se modificaron con la presencia de diferentes dosis de taninos, principalmente durante las primeras doce horas de iniciada la fermentación, aunque los perfiles de liberación de gas fueron similares. En ambos híbridos las mayores tasas se presentaron a las tres horas de iniciada la incubación para 0 y 50, y tres horas después (seis) para las dosis de 100 y 150. Además, a medida que aumentaba la proporción de taninos disminuyeron las tasas de producción de gas en ambos híbridos durante las primeras doce horas y dichas disminuciones fueron diferentes ($P < 0,05$) entre todas las proporciones en ambos híbridos (Figuras 11 y 12). Esto ratifica el impacto que tienen los taninos condensados sobre las primeras horas de la fermentación ruminal (Reina *et al.*, 2007).

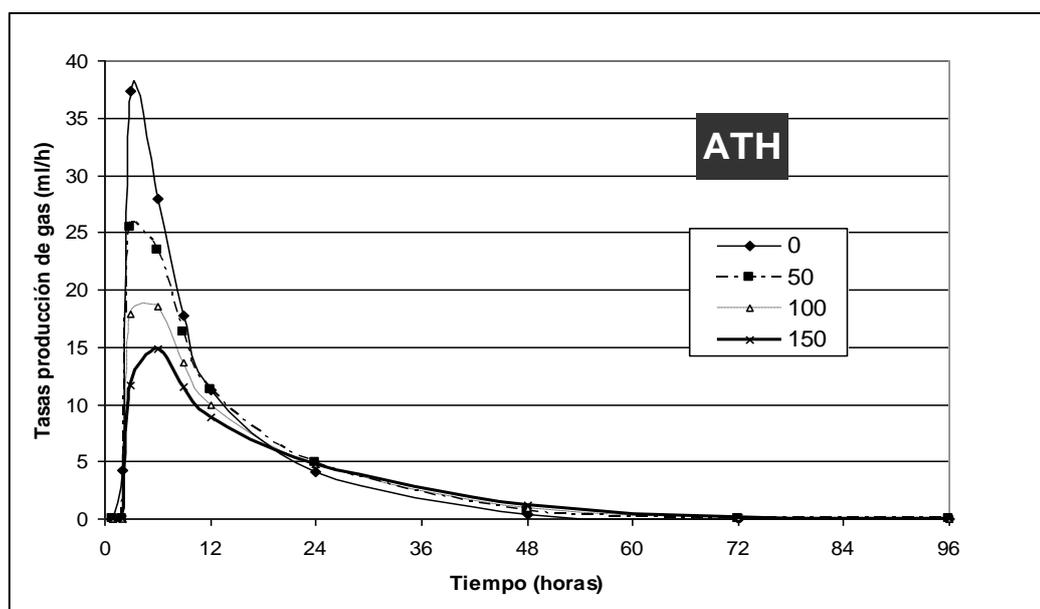


Figura 11: Tasas de producción de gas *in vitro* producto de la fermentación del grano húmedo de sorgo ATH con diferentes porcentajes de agregado de taninos (0, 50, 100 y 150), valores promedios de taninos provenientes de granos ensilados y no ensilados.

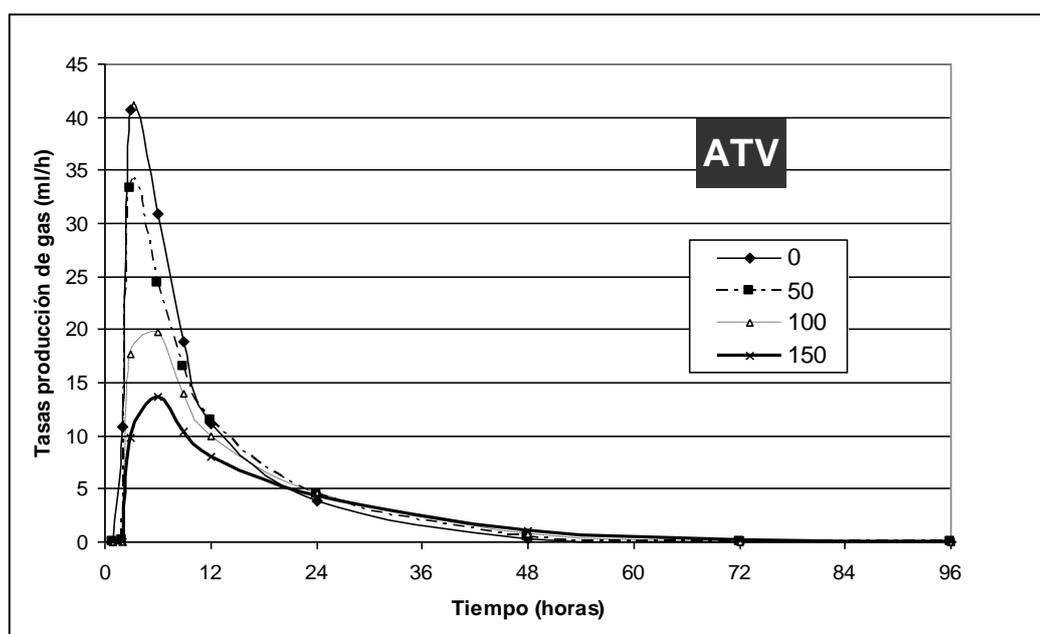


Figura 12: Tasas de producción de gas *in vitro* producto de la fermentación del grano húmedo de sorgo ATV con diferentes porcentajes de agregado de taninos (0, 50, 100 y 150) valores promedios de taninos provenientes de granos ensilados y no ensilados

Reina *et al.* (2007) resaltaron que la mayor variación relativa y el mayor impacto de los taninos presentes en los granos de sorgo ocurren durante las primeras

12 horas de incubación, ya que durante ese período vieron incrementadas la producción acumulada total en un 13% y las tasas de gas *in vitro* de producción cuando los taninos no ejercieron su efecto negativo porque fueron bloqueados con polietilenglicol. Dichos autores también detectaron un incremento en la fase de latencia o *lag time* ante la presencia de taninos, de manera similar a lo observado en este trabajo.

Pires (2007) observó en silajes de líneas isogénicas de sorgos que diferían solo en contenido de taninos, con y sin taninos, que la producción acumulada de gases y la degradabilidad de la materia seca fueron superiores, en un 18 y 40% respectivamente, en la línea sin taninos comparado con la otra. Esta comparación sugiere que los taninos comprometen la degradabilidad y la producción de gas del genotipo que presenta alto contenido de dicho factor antinutricional.

Davis y Hosney (1979a) observaron que los taninos aislados de granos de sorgo son capaces de producir inhibición en la actividad de la α -amilasa. El gas producido *in vitro* por un híbrido de sorgo molido con alta cantidad de taninos fue la mitad respecto a uno sin taninos (Saba *et al.*, 1972). Resultados similares hallaron Streeter *et al.* (1990a) quienes observaron que la producción de dióxido de carbono fue significativamente ($P < 0.01$) menor en los sorgos alto en taninos luego de 6 y 12 horas de incubación, al comparar uno waxy vs waxy con taninos, y uno normal vs normal con taninos. La baja producción de gas en sorgos con taninos molidos probablemente resulta de la inactivación de la amiloglucosidasa por los taninos (Rooney y Pflugfelder, 1986).

Hinder y Eng (1971) evaluaron el efecto de los taninos sobre la disponibilidad del almidón a través de la producción de gas de granos molidos de tres diferentes genotipos: 1) tres híbridos con endosperma córneo y sin taninos, 2) tres híbridos con endosperma normal y sin taninos y 3) dos híbridos con alto contenido de taninos. Dichos autores hallaron diferencias en la producción de gas, y la misma fue dos veces superior en los genotipos sin taninos respecto a los con taninos (2.4, 2.9 y 1.2 ml gas/hora para sorgos con endosperma córneo, harinoso y con taninos respectivamente). De manera similar, McGinty y Riggs (1968) evaluaron *in vitro* la digestibilidad del endosperma de tres híbridos diferentes de sorgo sin hallar diferencias entre los mismos. Sin embargo, cuando les agregaron el pericarpio de dos de ellos (altos en taninos) observaron una disminución de la digestibilidad. Esto indicaría que los taninos tienen una fuerte influencia sobre la degradabilidad del almidón y que a su vez podría ser más importante su efecto que el del tipo de endosperma.

La reducción de producción de gas, como consecuencia de la presencia de taninos no solo se ha detectado en el grano de sorgo, sino también en otras especies que contienen dichas sustancias (Leinmuller *et al.*, 1991; Waghron *et al.*, 1994; Aharoni *et al.*, 1998; Abdulzarak *et al.*, 2000; Hervás *et al.*, 2000). Además, la reducción del ritmo de la degradación ruminal de los alimentos es uno de los efectos más indicados de los taninos (Makkar *et al.*, 1995b; Salawe *et al.*, 1997 a y b), de manera similar a lo ocurrido con los genotipos altos en taninos evaluados en este experimento.

Partiendo del principio que los gases producidos dentro de fermentadores reflejan la degradación del material incubado, las tasas y el máximo potencial de producción de gases son los principales parámetros para evaluar la calidad del grano a través de esta técnica. Por lo tanto, los granos serían más fermentables o digestibles cuando presentan los mayores valores de producción de gas potencial asociados con altas tasas y una mayor fermentación en menos tiempo de incubación. En este ensayo, el agregado en forma progresiva de taninos disminuyó la fermentación de los granos ATH y ATV, lo cual confirmaría que el efecto de los taninos es dependiente de la concentración en la que se presenten en el grano (Schaffert *et al.*, 1974; Rodriguez *et al.* 1999; Montiel, 2003; Riffel, 2007). Además, dicho efecto es independiente de si los taninos provenían de pericarpios de granos ensilados o no ensilados, lo cual indicaría que el proceso de ensilado no modificaría la actividad inhibitoria de los taninos ya que no se hallaron efectos debidos al método de almacenamiento. Esto sugiere que la mejora en la digestión de los granos generada por el proceso de ensilado estaría dada por una disminución en la cantidad de taninos y no por una disminución en su actividad.

6.3.2.- Ensayo de engorde a corral (Experimento 8).

La composición química y la digestibilidad de los diferentes silajes de granos utilizados en el ensayo se presentan en la Tabla 20. En términos generales los contenidos de PB y ALM fueron similares entre los diferentes granos, sin ser afectados por el nivel de taninos ni la vitrosidad del grano. Los pH de los silajes de granos tampoco fueron similares entre los genotipos y en promedio de 4,04 (Tabla 20). Los bajos pH registrados en los silajes obtenidos en este trabajo, indican que el proceso de

fermentación y las características de conservación fueron adecuadas y garantizando la estabilidad en condiciones de acidez por un largo período de tiempo.

Numéricamente la DIVMS a las 48 horas fue superior en el sorgo Blanco, intermedia en el ATV e inferior en el ATH (Tabla 20). A pesar de presentar similares contenido de almidón, el genotipo Blanco fue en promedio un 8% más digestible respecto a los altos en taninos, lo cual indica el efecto de dichas sustancias sobre la digestión de los granos. Numerosos autores han indicado que la digestibilidad de un grano con alto contenido de taninos es menor que un genotipo con bajo o sin taninos (Saba *et al.*, 1972; Schaffert *et al.*, 1974; Hibberd *et al.*, 1982a; Hibberd *et al.*, 1985; Streeter *et al.*, 1990 a; Montiel, 2003; Riffel, 2007).

Si bien los genotipos no presentaron diferencias en el contenido de PB, siendo en promedio 7,04%, el porcentaje de N-NH₃/NT fue numéricamente un 77% en promedio superior en el sorgo Blanco respecto al ATV y ATH. Como se indicó anteriormente, en el capítulo 1, la mayor producción de N-NH₃/NT en el silaje de grano húmedo del genotipo Blanco, se debe a la acción de las bacterias proteolíticas que están presentes durante el proceso de ensilado, y que nos son inhibidas por la presencia de los taninos (Gonçalves *et al.*, 1999; Albrecht; Muck, 1991).

Tal como se busco de acuerdo a los objetivos del ensayo, las concentraciones de taninos entre los genotipos ATV y ATH respecto al Blanco (sin taninos) fueron notablemente diferentes (Tabla 20).

Tabla 20: Parámetros químicos y fermentativos de los diferentes silajes de granos húmedos de sorgos utilizados en el ensayo de producción

	DIVMS (%) ¹	PB (%) ¹	ALM (%) ¹	N-NH ₃ /NT (%) ¹	pH ¹	Taninos ^{1,2}
Blanco	82,5 (1,41)	7,07 (0,20)	67,5 (1,15)	4,62 (0,11)	3,79 (0,25)	38,7 (4,43)
ATH	75,5 (0,72)	7,26 (0,15)	65,9 (2,80)	2,59 (0,16)	4,13 (0,30)	202,9 (22,41)
ATV	77,7 (0,98)	6,80 (0,55)	63,7 (1,30)	2,62 (0,20)	4,21 (0,34)	195,1 (13,04)

¹: Valor promedio y desvío estándar ubicado entre paréntesis. ²: mg eq. de ácido tánico / 100 g de muestra, base materia seca (Método de Folin Denis).

La composición química de las dietas correspondientes a los tres tratamientos evaluados, fueron estimadas a partir de los componentes individuales y se presentan

en la Tabla 21. Las dietas resultaron numéricamente similares en los niveles de proteína y de almidón, siendo los porcentajes promedio de 14,8 y 49,1% para proteína bruta y almidón respectivamente.

La concentración de energía metabolizable de la dieta que contenía el grano Blanco fue numéricamente un 5% superior a las dietas que contenían los granos con taninos (Tabla 21). Estas diferencias, si bien es mínima, pueden estar relacionadas con la digestibilidad *in vitro* hallada en los distintos silajes de grano (Tabla 20), ya que los mismos constituyen el componente principal de las raciones, o sea el 70% de las mismas.

Tabla 21: Composición química y contenido de nutrientes de las diferentes dietas.

Composición química (%MS)	Dietas ¹		
	Blanco	ATV	ATH
Proteína bruta	14,9 (0,15)	14,4 (0,39)	15,0 (0,11)
Almidón	50,3 (0,75)	47,7 (0,91)	49,3 (2,02)
EM (Mcal/kg MS) ²	2,84 (0,04)	2,71 (0,02)	2,69 (0,02)

¹: Valor promedio y desvío estándar ubicado entre paréntesis.

²: EM: energía metabolizable estimada a partir de los valores de digestibilidad de cada uno de los componentes de la dieta (3,6 x DMS; AOAC, 1995).

Las respuestas productivas de las terneras alimentadas con dietas a base de silaje de grano de sorgo húmedo de diferentes genotipos se presentan en la Tabla 22. El peso vivo de los animales al inicio del experimento fue similar entre los tratamientos ($P>0,05$), pero difirió al final del mismo, siendo superior en los tratamientos Blanco y ATV respecto al ATH (Tabla 22).

Los CMS (expresado tanto en kg/día como en porcentaje del peso vivo) fueron superiores ($P<0,05$) en los genotipos con alto contenido de taninos e inferior en el Blanco (Tabla 22). A su vez, no se observaron diferencias debidas al efecto de la textura del endosperma, ya que los consumos entre el ATH y ATV fueron similares ($P>0,05$).

Los CMS en los tratamientos ATV y ATH fueron en promedio un 16% mayor respecto al tratamiento Blanco. Al igual de lo ocurrido en este trabajo, existen evidencias de que los animales que consumen sorgos altos en taninos pueden tener

consumos mayores respecto a los bajos en taninos. Recientemente, Riffel (2007) observó que los animales a los que se les suministraban raciones con granos húmedos de sorgos altos en taninos consumían un 17% más de ración si se comparaban con aquellos que comían raciones con sorgos bajos en taninos o maíz. Por su parte, Maxson *et al.* (1973) informaron que novillos, de aproximadamente 320 kg de peso vivo, alimentados con granos de sorgo alto taninos consumieron 14% más respecto a los bajos taninos. Además, McCollough *et al.* (1972a) encontraron aumentos en el consumo en el tratamiento de sorgo alto en taninos respecto al bajo taninos del orden del 9%.

El efecto negativo de los taninos condensados sobre el consumo de alimentos, es un tema de controversias y frecuente discusión ya que los resultados hallados no han sido consistentes entre los ensayos. Generalmente se indica que los taninos limitan el consumo por su efecto astringente (Kumar; Singh, 1974), lo cual provoca una baja palatabilidad del tejido del alimento en el cual se localizan debido a que causan la precipitación de las proteínas de la saliva (Kumar; Vaithyanathan, 1990; Waghorn, 2008). Por esta razón, la reducción en el consumo voluntario de hojas de plantas, arbustos y árboles que contienen elevada concentración de dichos compuestos en ovejas y novillos, se atribuyen al efecto de la baja palatabilidad provocada por la presencia de los taninos (Kumar; Singh, 1974).

Swell (1993) realizó una revisión de varios ensayos donde se utilizaron diferentes genotipos de granos de sorgo, alto y bajo en taninos. Dicho autor indicó, que si bien en algunos ensayos los animales consumieron menos el sorgo con taninos, cuando dicho grano ingresaba en una dieta en alta proporción en raciones de engorde, los consumos los animales a los que se les ofrecían los genotipos altos en taninos fueron superiores a los que comían granos bajos en taninos. Swell (1993) concluyó que para compensar el menor nivel de energía que presentan las dietas de los granos altos en taninos, los animales deben aumentar el consumo de las mismas. Un comportamiento similar se obtuvo en este ensayo, ya que como se muestran en la Tabla 22 los animales que consumieron las dietas ATH y ATV debieron consumir un 16% más de ración respecto a la dieta sin taninos (Blanco) para obtener las ganancias de peso vivo alcanzadas. El aumento en el CMS de la ración en los genotipos altos en taninos también repercutió en el consumo de EM total por día. Dichos consumos fueron de 20,1, 18,6 y 17,1 Mcal EM para los animales que consumieron los tratamientos ATV, ATH y Blanco respectivamente. No se hallaron diferencias entre los dos tratamientos altos en taninos ($P=0,20$) y ambos fueron diferentes del tratamiento

Blanco ($P=0,007$ y $P=0,08$, para ATV y ATH, respectivamente). Esto indica que debido a la menor digestibilidad del grano en los genotipos altos en taninos, dichos animales deben aumentar los consumos de la ración para poder sostener las ganancias de peso que se obtuvieron en el ensayo. Al ser dietas bajas en fibras, por poseer un 70% de grano en la misma, los animales no tuvieron limitaciones físicas en el consumo, y por lo tanto pudieron incrementar la cantidad de materia seca consumida en los tratamientos ATV y ATH. Además, estos resultados indican que con los niveles de taninos que poseen estos genotipos no hay efectos deletéreos sobre el consumo de la materia seca del grano de sorgo.

Los animales aumentaron aproximadamente un kilogramo de peso vivo por día, siendo dicho incremento diferente entre los tratamientos y acordes al tamaño corporal y peso de los animales. El ADPV fue superior ($P<0,05$) en las terneras que comían la dieta con sorgo Blanco e inferior en las que comían el genotipo ATH (Tabla 22). El tratamiento ATV fue intermedio y no fue estadísticamente ($P>0,05$) diferente del Blanco ni del ATH.

Maxson *et al.* (1973) comparó la ganancia de peso de novillos de 320 kg alimentados con dietas a base de maíz, sorgo bajo en taninos y sorgo alto en taninos y no halló diferencias en las ganancias de peso entre los animales que comían los sorgos alto y bajo en taninos, pero sí respecto al maíz. Riffel (2007) halló que los animales alimentados con granos de sorgo alto y bajo en taninos presentaron ganancias similares de pesos vivo, a pesar del mayor consumo de las dietas con sorgos altos en taninos. En ovejas, Wester *et al.* (1992), no hallaron diferencias en las ganancias de pesos entre tres híbridos bajos en taninos y uno alto en taninos, pero sí en las eficiencias de conversión del grano, siendo la más baja la del híbrido alto en taninos.

Los resultados que se obtuvieron en este ensayo indican que los bovinos pueden modificar su nivel de consumo de acuerdo a la disponibilidad de energía presente en la ración con el objeto de mantener un determinado nivel de ganancia de peso. Este es el caso de los animales que consumieron los genotipos altos en taninos (ATV y ATH) quienes aumentaron los consumos de las raciones para poder sostener las ganancias de pesos obtenidas en el ensayo (Tabla 22). Esta respuesta está asociada a la menor digestibilidad *in vitro* (Tabla 20) que presentan estos genotipos por la presencia de los taninos condensados y por lo tanto el menor aporte de energía. A medida que se incrementa la concentración energética de la dieta, la ganancia diaria de peso vivo mejora, siempre que el consumo no disminuya (Meissner *et al.*, 1995). En

este ensayo, el tratamiento Blanco solo se diferenci6 en ADPV del tratamiento ATH, y no del ATV, posiblemente porque los primeros presentaron menores consumos de materia seca de la dieta.

Tabla 22: Respuestas productivas de terneras alimentadas con dietas constituidas con diferentes silajes de granos de sorgo.

Item	BLANCO ¹	ATV ¹	ATH ¹	Valor P	EEM
PV ² inicial (kg)	185,6	191,1	187,3	0,27	2,02
PV final (kg)	249,9 a	251,8 a	240,5 b	0,01	1,34
CMS (kg/día)	6,14 b	7,40 a	6,90 a	0,03	0,15
Consumo (% PV)	3,0 b	3,37 a	3,28 a	0,02	0,065
ADPV (kg/día)	1,15 a	1,08 ab	0,96 b	0,01	0,03
EC (kg ADPV/kg CMS)	0,19 a	0,15 b	0,14 b	0,01	0,006
EGDI ³ (mm)	3,09 b	3,71 a	3,13 b	0,03	0,18
EGDF ⁴ (mm)	5,65	5,92	5,51	0,56	0,28
TE ⁵ (mm/30d)	1,57	1,34	1,46	0,18	0,13

¹Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$, Test Tukey-Kramer). EEM: error estándar de la media.

²PV: peso vivo. ³EGDI: espesor de grasa dorsal inicial. ⁴EGDF: espesor de grasa dorsal final. ⁵TE: tasa de engrasamiento.

Las eficiencias de conversi6n del alimento obtenidas fueron diferentes entre los tratamientos y estuvo afectada por el nivel de taninos en el grano y no por la textura del endosperma (Tabla 22). El tratamiento Blanco fue un 31% m6s eficiente ($P < 0,05$), siendo los tratamientos ATV y ATH los que necesitaron m6s alimento para producir un kg de peso vivo, a su vez entre ellos no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). Como consecuencia del menor consumo de los animales que ingirieron la dieta con el genotipo Blanco y la mayor ganancia de peso, solo expresada numéricamente, se produjo la mayor eficiencia de conversi6n en este tratamiento.

El efecto adverso que ejercen los taninos sobre la eficiencia de conversi6n esta atribuido a la interferencia de los taninos con la energía que aporta el grano, dada por la menor digestibilidad de la proteína y por consiguiente del almid6n. Los taninos en el grano de sorgo no causan problemas de toxicidad en los animales que consumen dicho grano, pero la eficiencia de conversi6n del mismo puede disminuir dependiendo de la especie animal que la consuma, el m6todo de procesamiento del grano, y de la proporci6n en que ingresen en la dieta (Hahn *et al.*, 1984). La eficiencia de conversi6n del alimento puede reducirse entre un 10 a un 30% comparando un sorgo alto tanino

versus uno bajo, y los animales generalmente necesitan consumir más alimento para producir la misma o menores ganancias de peso (Hahn et al., 1984; Rooney, 2005). Un comportamiento similar fue el obtenido con los animales en este experimento, ya que los animales que consumieron los genotipos altos en taninos (ATV y ATH) debieron consumir en promedio 1,7 kg más de ración para producir un kilo de peso vivo respecto a los que consumieron el genotipo Blanco.

Existen algunos trabajos que coinciden sobre el efecto negativos de los taninos sobre la eficiencia de conversión del alimento en bovinos y ovinos. McCollough *et al.* (1972a) hallaron menores eficiencias de conversión en novillos alimentados con grano de sorgo alto en taninos respecto al bajo en taninos (0,097 vs 0,13 kg de ganancia de peso / kg de alimento consumido). Maxson *et al.* (1973), observaron en novillos alimentados a corral con granos de sorgo seco, que los animales a los que se les asignaron los sorgos altos en taninos tuvieron que consumir un 31% más de materia seca de la ración respecto a aquellos a los que se les suministró granos bajos en taninos, para alcanzar una similar performance en ganancia de peso, similar a lo ocurrido en este ensayo. Cabe aclarar que la proporción de los granos en esas dietas fue alta (78%) similar a la utilizada en esta tesis, lo cual indica que la diferencia entre los tratamientos estuvo en gran medida atribuida al tipo de grano de sorgo. A partir de resultados de ensayos de engorde de 270 novillos con trece híbridos de sorgo, McCollough (1973) halló que los animales alimentados con sorgos denominados resistentes a pájaros, con alto contenido de taninos, presentaron las peores eficiencias de conversión, atribuido esto a una menor digestibilidad aparente de proteína del grano y a un menor aporte de energía. Evaluando la respuesta productiva en otra especie como los ovinos, se halló que aquellas ovejas alimentadas con sorgo alto en taninos presentaron una eficiencia de conversión 12% inferior (0,188 vs 0,210 g de ganancia de peso vivo/ g de alimento consumido) respecto a las alimentadas con bajo taninos (Wester *et al.*, 1992).

Stock *et al.* (1987) y Wester *et al.* (1992) indicaron una fuerte relación lineal y positiva entre la desaparición *in vitro* del almidón y la eficiencia de conversión en bovinos, expresada como la relación entre la ganancia de peso obtenida y el alimento consumido, aumentado la misma a medida en los genotipos incrementan las tasas de desaparición del almidón. Los híbridos de sorgo con alto contenido de taninos al presentar una menor digestibilidad, resultan en una disminución en la performance animal comparado con los bajos en taninos (Maxson *et al.*, 1973; Hahn *et al.*, 1984; Rooney; Pflugfelder, 1986).

La vitrosidad del grano no modificó la eficiencia de conversión de la dieta. Esto puede deberse a efectos provocados por el proceso de ensilado o por la humedad del grano. Phillippeau; Michalet-Doreau (1998) indicaron que el ensilado provoca una solubilización parcial de la matriz proteica a causa de la proteólisis que tiene lugar en el mismo proceso. Además, a medida que aumenta el contenido de agua (dentro del rango comprendido entre grano seco y la madurez fisiológica) se obtienen menores valores porcentuales de vitrosidad (Correa *et al.*, 2002). Por lo tanto la vitrosidad del grano y el contenido de materia seca están altamente correlacionados (Phillippeau; Michalet-Doreau, 1998). Esto indicaría que el ensilado del grano podría minimizar las diferencias entre los genotipos vítreo y harinoso.

Los valores promedios de EGDI, EGDF y tasas de engrasamiento de los animales durante los 56 días de engorde se presentan en la Tabla 22. La única variable que fue significativamente diferente entre los tratamientos fue el EGDI, el cual fue superior ($P < 0,05$) en los animales que consumieron la dieta correspondiente al ATV (Tabla 22), a pesar de que los animales fueron previo al inicio del ensayo aleatorizados dentro de cada tratamiento. Los EGDI de los otros dos tratamientos, Blanco y ATH, fueron similares entre sí ($P > 0,05$).

A diferencia de lo planteado anteriormente, los EGDF y las tasas de engrasamientos no fueron diferentes entre los tratamientos ($P > 0,05$), siendo en promedio de 5,69 mm y 1,46 mm/30 días, respectivamente. La falta de diferencias en las tasa de engrasamiento y en los EGDF, posiblemente se deban a que por la edad y el peso de los animales en ese momento del crecimiento haya depuesto más grasa visceral o interna, y no tanta grasa del tipo subcutánea, ya que dicho tipo de grasa es una de las últimas en depositarse.

Si bien no existe abundante bibliografía publicada donde se indiquen las mediciones de los espesores de grasa dorsal subcutánea y las tasas de engrasamiento de los animales, al menos hay tres trabajos, donde se presentan dichas variables. McCollough (1972b) evaluando 8 híbridos de sorgo, entre los cuales había uno alto en taninos, y tres maíces no hallaron diferencias en los espesores de grasa dorsal de los animales a la faena luego de 126 días de engorde. A pesar de ello, el híbrido alto en taninos fue el que presentó la peor eficiencia de conversión alimenticia y no hallaron diferencias en las ganancias de peso. Además, Maxson *et al.* (1973) obtuvieron similares espesores de grasa dorsal subcutánea entre novillos alimentados con tres diferentes dietas que tenían más de 78% de grano (maíz, sorgo bajo en taninos o sorgo alto en taninos). Por último, Krueger *et al.* (2010), luego de 42

días de engorde de novillos alimentados con dietas con alto contenido de grano, tampoco encontraron efectos de los taninos sobre el espesor de grasa dorsal subcutánea. De manera similar a lo ocurrido en esta tesis, en todos los trabajos citados anteriormente, a pesar de diferir en el peso de los animales y el sexo, el contenido de taninos no tuvo efectos sobre las tasas de engrasamiento de los animales.

6.4.- Conclusiones

El proceso de ensilado aumentó la proteólisis en el genotipo Blanco, disminuyendo el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la fermentación total dado por un incremento en la tasa de producción cuando se incubó únicamente el endosperma del grano. En los híbridos con alto contenido de taninos y con diferentes texturas de endosperma el proceso de ensilado no afectó ninguno de los parámetros evaluados sobre el endosperma.

El agregado en forma progresiva de taninos disminuyó la fermentación de los granos independientemente si los pericarpios provenían de granos ensilados o no ensilados, ya que dicha disminución fue dependiente de la dosis y no del procesamiento previo al que fue sometido el grano. El proceso de ensilado no modificaría la actividad de los taninos ya que no se hallaron efectos debidos al método de almacenamiento, sugiriendo que la mejora en la digestión de los granos estaría dada por una disminución en la cantidad de taninos y no de su actividad.

Los animales alimentados con sorgos altos en taninos con diferentes texturas del endosperma (vítrea o harinosa) no presentaron diferencias entre sí en los parámetros productivos evaluados sobre terneras alimentadas a corral. La presencia de taninos en el grano influyó en forma negativa en la eficiencia de conversión del alimento en ganancia de peso respecto al sorgo blanco sin taninos.

7. CONCLUSIONES GENERALES

Los taninos presentes en el grano de sorgo le confieren características de anticalidad, por lo cual se ve afectada la digestibilidad y el aprovechamiento del mismo por parte de los animales.

A través de la cosecha anticipada del grano con alto contenido de humedad y del ensilado del mismo, se logró de la manera efectiva aumentar la digestibilidad *in vitro* y la desaparición *in situ* de la MS, PB y ALM de los mismos. La humedad de cosecha influyó de manera directa sobre dichas respuestas, pero fueron independientes del contenido de taninos del grano. Como consecuencia de esto, se acepta la hipótesis 1, con excepción de lo referido a la fracción soluble, ya que la misma no pudo ser determinada fehacientemente.

El proceso de ensilado del genotipo alto en taninos produjo una notable disminución en la concentración de los taninos, y por consiguiente hubo un incremento de la desaparición *in situ* a nivel ruminal de la MS, PB y ALM del grano. Esto confirma la aceptación de la hipótesis 2. El proceso fermentativo que se produce durante el ensilado del grano húmedo de sorgo sería una técnica de bajo costo que permitiría mejorar la calidad nutricional del grano disminuyendo los efectos negativos de asociados a la presencia de taninos.

Otra manera de reducir el efecto negativo de los taninos en el grano de sorgo fue a través de la utilización de sustancias para el tratamiento de los mismos. La utilización de PEG-4000 o de urea en granos altos en taninos fue efectiva para aumentar la desaparición ruminal de la MS, PB y ALM de los granos. El PEG-4000 tuvo una mayor respuesta respecto a la urea, y ambos tuvieron efectos positivos respecto a los granos no tratados. Como consecuencia de esto se acepta la hipótesis 3.

Las respuestas obtenidas con la aplicación de PEG-4000 o urea fueron dependientes de las dosis en que se aplicaron ambos compuestos y de la humedad que contenía el grano al momento de recibir el tratamiento, lo cual confirma la interacción entre el contenido de humedad y las dosis (se acepta la hipótesis 4). Solo se obtuvieron respuestas positivas en granos cosechados con 35% de humedad y tratados con 1 g de PEG-4000/g PB del grano o con 2% de urea en base a la materia seca. Además, la capacidad de capturar taninos que tiene el PEG-4000 no fue

afectada por el proceso de ensilado, siendo similar su efecto sobre granos que no fueron ensilados.

Los taninos condensados no solo disminuyen la desaparición ruminal del grano, sino que también afectan la digestión aparente del mismo, siendo los mayores efectos sobre la disponibilidad de las proteínas y por consiguiente del almidón. La incorporación a granos húmedos de sorgo de sustancias como el PEG-4000 o la urea permitieron aumentar la digestibilidad total aparente de las dietas que contenían dichos granos, respecto a uno no tratado (se acepta la hipótesis 5). El tratamiento del grano de sorgo con sustancias que capturen los taninos (PEG-4000) o que impidan las uniones proteína-taninos (urea) es una herramienta promisorio que permite aumentar la digestibilidad aparente del grano, y sería conveniente evaluarla en ensayos donde se evalúe la respuesta productiva de bovinos, en zonas donde no es posible utilizar genotipos de sorgo con bajo contenido de taninos.

El proceso de ensilado de híbridos con diferentes texturas del endosperma (vítreo y harinoso) y con alto contenido de taninos no tuvo efecto sobre el endosperma del grano, siendo evaluados dichos efectos a través de la producción de gas *in vitro*. Dicho proceso de ensilado, si tuvo efecto sobre el genotipo sin taninos, aumentando la proteólisis durante el mismo, lo cual repercutió incrementando la tasa de producción de gas cuando se incubó solo el endosperma.

Agregar taninos, propios del grano, en diferentes dosis disminuye la fermentabilidad de los mismos independientemente si los pericarpios portadores de los taninos provenían de granos ensilados o no. La disminución de la fermentabilidad del grano, evaluada a través de la producción de gas *in vitro*, fue dependiente de la dosis en la que se aplicó y no del procesamiento al que fue sometido previamente el grano. Esto indica, que el proceso de ensilado no modificaría la actividad inhibitoria de los taninos, y la mejora en la digestión que se observa cuando se ensila el grano, estaría por una disminución en la cantidad de los mismos.

Los parámetros productivos evaluados sobre terneras engordadas a corral con dietas que contenían granos de sorgo húmedo alto en taninos con diferentes texturas de endosperma (vítrea y harinosa) no presentaron diferencias, por lo cual se rechaza la primer parte de la hipótesis 6. A su vez, el genotipo alto tanino vítreo presentó ganancias diarias de peso vivo similares al Blanco (se rechaza la segunda parte de la hipótesis 6). La presencia de taninos en el grano influyó en forma negativa sobre la eficiencia de conversión del alimento en carne, siendo las terneras que consumieron la dieta con sorgo Blanco las más eficientes. Esto indica que cuando se utilizan granos

de sorgo húmedo como componente de las dietas de engorde a corral, la textura del endosperma no tendría efectos sobre el aprovechamiento del mismo, y si se debería tener en cuenta la presencia de los taninos en el grano.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABDELRAHMAN, A. A.; HOSENEY, R. C. 1984. Basis for hardness in pearl millet, grain sorghum, and corn. *Cereal Chem.* 61:232 - 235.
- ABDULRAZAK, S. A.; FUJIHARA, T.; ONDIEK, J. K.; ORSKOV, E. R. 2000. Nutritive evaluation of some Acacia tree leaves from Kenya. *Anim. Feed Sci. Tech.* 85: 89 – 98.
- AHARONI, Y.; GILBOA, N.; SILANIKOVE, N. 1998. Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. *Anim. Feed Sci. Tech.* 71: 251 – 267.
- ALBRECHT, K.A.; MUCK, R.E. 1991. Proteolysis in ensiled forage legumes that vary in tannin concentration. *Crop Sci.* 31: 464-469.
- ANGENAULT, J. 1999. Diccionario enciclopédico de química. Ed. CECSA. México. 352 p.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Washington, DC.
- ASQUITH, T. N.; BUTLER, L. G. 1986. Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry.* 25: 1591-1593.
- BARON, V.S.; STEVENSON, K.R.; BUCHANAM-SMITH, J.G. 1986. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 451-461.
- BARRY, T. N.; MANLEY, T. R. 1986. Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in Lotus sp. and their possible consequences in ruminant nutrition. *J. Food Sci. Agric.* 37: 248-254.
- BARRY, T. N.; McNABB, W. C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Brit. J. Nutr.* 81: 263-272.
- BEAUCHEMIN, K. A. ; Mc ALLISTER, T. A. ; FARR, B. A. ; CHENG, K. J. 1994. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. *J. Anim. Sci.* 72: 236-246.
- BEAUCHEMIN, K.A. ; YANG, W.Z. ; RODE, L.M. 2001. Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. *J. Anim. Sci.*, 79:1925-1936.
- BEN SALEM, H.; ATTI, N.; PRIOLO, P.; NEFZAOU, A. 2002. Polyethylene glycol in concentrate or feed blocks to deactivate condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. Foliage effects on feed intake, digestion and growth by lambs. *Anim. Sci.*, 75: 127-135.

- BEN SALEM, H.; SAGHROUNI, L.; NEFZAOU, A. 2005a. Attempts to deactivate tannins in fodder shrubs with physical and chemical treatments. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 122: 109-121.
- BEN SALEM, H.; BEN SALEM, I.; BEN SAÏD, M. S. 2005b. Effect of the level and frequency of PEG supply on intake, digestion, biochemical and clinical parameters by goats given kermes oak (*Quercus coccifera* L.)-based diets. *Small Rum. Res.*, 56:127-137.
- BIP, 2010. Guidelines for uniform beef improvement programs [en línea] <<http://www.beefimprovement.org/PDFs/guidelines/2010%20Guidelines%200,%209th%20Edition.pdf>> [consulta: 06 de junio 2010].
- BOREN, B.; WANISKA, R. D. 1992. Sorghum seed color as an indicator of tannin content. *J. Appl. Poultry Res.* 1: 117-121.
- BUTLER, L.G.; RIEDL, D.J.; LEBRYK, D. G.; BLYTT, H.J. 1984. Interactions of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 61:916-920.
- CABRAL FILHO, S.L.S. 2004. Efeito do teor de tanino do sorgo sobre a fermentação ruminal e parâmetros nutricionais de ovinos. Tesis para optar el grado en Doctor en Ciencias. Centro de Energía Nuclear na Agricultura. Universidad de São Paulo. Piracicaba. Estado de São Paulo. Brasil. 88 p.
- CABRAL FILHO, S.L.S.; ABDALLA, A.L.; BUENOA, I.C.S.; NOZELLA, E.F.; RODRIGUEZ, J.A.S. 2005. Ruminal fermentation and degradability of sorghum cultivar whole crop, and grains, using an *in vitro* gas production technique. *Anim. Feed Sci. Techn.* 123-124: 329-339.
- COUSINS, B. W.; TANKSLEY, T. D. Jr.; KNABE, D. A.; ZEBROWSKA, T. 1981. Nutrient digestibility and performance of pigs fed sorghums varying in tannin concentration. *J. Anim. Sci.* 53:1524-1537.
- CORREA, C.; SHAVER, R.; PEREIRA, M.; LAUER, J.; KOHN, K. 2002. Relationship between corn vitreousness and ruminal *in situ* starch degradability. *J. Dairy Sci.* 85: 3008 – 3012.
- CUMMINS. D. G. 1971. Relationships between tannin content and forage digestibility in sorghum. *Agron. Journal.* 63: 500-502.
- CHANDRASHEKAR, A.; KIRLEIS, A. W. 1988. Influence of protein on starch gelatinization in sorghum. *Cereal Chem.* 65:457-462.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.*, 8:130-132.
- CHAVAN, J. K.; KADAN, S. S.; GHONSIKAR, C. P.; SALUNKHE, D. K. 1979. Removal of tannins and improvement of *in Vitro* protein digestibility of sorghum seeds by soaking in alkali. *J. Food Sci.* 44: 1319 -1321.

- CHIBBER, B. A. K.; MERTZ, E. T.; AXTELL, J. D. 1978. Effects of dehulling on tannin content, protein distribution, and quality of high and low tannin sorghum. *J. Agric. Food. Chem.* 26: 679 - 683.
- CHIBBER, B. A. K.; MERTZ, E. T.; AXTELL, J. D. 1980. *In vitro* digestibility of high-tannin sorghum at different stages of dehulling. *J. Agric. Food Chem.* 28: 160 – 161.
- DAVIS, A. B.; HOSENEY, R. C. 1979 a. Grain sorghum condensed tannins. I. Isolation, estimation, and selective adsorption by starch. *Cereal Chem.* 56: 310-314.
- DAVIS, A. B.; HOSENEY, R. C. 1979 b. Grain sorghum condensed tannins. II. Preharvest changes. *Cereal Chem.* 56: 314-316.
- DUODU, K. G.; TAYLOR, J.R.N.; BELTON, P.S.; HAMAKER. B. R. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 38: 117-131.
- DÜRSELEN, G. 1988. Influencia de los taninos del grano de sorgo sobre los sitios de digestión de las fracciones de la materia orgánica. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 111p.
- DYKES, L.; ROONEY, L. W. 2006. Sorghum millet phenols and antioxidants. *J. Cereal Sci.* 44: 236-251.
- EARP, C. F.; AKINGBALA, J. O.; RONG, S. H.; ROONEY, L. W. 1981. Evaluation of several methods to determine tannins in sorghum with varying kernel characteristics. *Cereal Chem.* 58: 234-238.
- EARP, C. F.; McDONOUGH, C. M.; ROONEY, L. W. 2004. Microscopy of pericarp development in the caryopsis of *Sorghum bicolor* (L) Moench. *J. Cereal Sci.* 39: 303 – 311.
- ELIZALDE, J. C.; MERCHEN, N. R.; FAULKNER, D. B. 1999. Supplemental cracked corn for stress fed fresh alfalfa: II. Protein and amino acid digestion. *J. Anim. Sci.* 77: 467 – 475.
- EVERS, A. D.; BLAKENEY, A. B.; O'BRIEN, L. 1999. Cereal structure and composition. *Aust. J. Agric. Res.* 50:629-650.
- FORD, J. E.; HEWITT, D. 1979 a. Protein quality in cereals and pulses. 2. Influence of polyethyleneglycol on the nutritional availability of methionine in sorghum (*Sorghum vulgare* Pers.), field beans (*Vicia faba* L.) and barley. *Br. J. Nutr.* 42: 317-323.
- FORD, J. E.; HEWITT, D. 1979 b. Protein quality in cereals and pulses. 3. Bioassays with rats and chickens on sorghum (*Sorghum vulgare* Pers.), barley and field beans (*Vicia faba* L.). Influence of polyethylene glycol on digestibility on the protein in high-tannin grain. *Br. J. Nutr.* 42: 325-340.

- FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODORUO, M. K.; LISTER, S. J.; DAVIES, D. R.; ISAC, D. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *J. Theoret. Biol.* 163: 99 – 111.
- FRIGGENS, N.C., OLDHAM, J.D., DEWHURTS, R.J., Y G. HORGAN. 1998. Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *J. Dairy Sci.* 81:1331-1344.
- FRUTOS, P., HERVÁS, G., GIRÁLDEZ, F. J., MANTECÓN, A. R. 2004. An *in vitro* study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid in rumen fermentation in sheep, goats, cows, and deer. *Aust. J. Agr. Res.* 55: 1125-1132.
- GALYEAN, M. L.; WAGNER, D. G.; OWENS, F. N. 1981. Dry matter and starch disappearance of corn and sorghum as influenced by particle size and processing. *J. Dairy Sci.* 64:1804-1812.
- GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. 2000. Effects of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Br. J. Nutr.* 84: 73-83.
- GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, F. S.; NOGUEIRA, F. C.; BORGES, A. L. C. C.; ZAGO, C. P. 1999. Silage de sorgo de porte Baixo, com diferentes teores de tanino e de umidade no colmo. III. Quebra de compostos nitrogenados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51: 571-576.
- GUIRAGOSIAN, V.; CHIBBER, B. A. K.; VAN SCOYOC, S.; JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E. T.; AXTELL, J. D. 1978. Characteristics of proteins from normal, high lysine, and high tannin sorghums. *J. Agric. Food Chem.* 26:219-223.
- GU, L.; KELM, M.; HAMMERSTONE, J.F.; BEECHER, G.; CUNNIGHAM, D.; VANNOZZI, S.; PRIOR, L. 2002. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4852-4860.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.* 26: 809 - 812.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. 1980. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *J. Agric. Food Chem.* 28: 944 - 947.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 256: 4494 - 4497.
- HAGERMAN, A. E.; ROBBINS, C. T.; WEERASURIYA, Y.; WILSON, T.C.; McARTHUR, C. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *J. Rang. Manag.* 45: 57 - 62.
- HAHN, D.H.; ROONEY, L.W.; EARP, C.F. 1984. Tannins and phenols of sorghum. *Cereal Food World.* 29: 776 - 779.

- HAHN, D.H.; ROONEY, L.W. 1986. Effect of genotype on tannins and phenols of sorghum. *Cereal Chem.*, 63: 4 - 8.
- HALE, W. H. 1973. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. *J. Anim. Sci.* 37:1075-1080.
- HARRIS, H.B.; CUMMINS, D.G.; BURNS, R.E. 1970. Tannins content and digestibility of sorghum grain as influenced by bagging. *Agron. J.* 62: 633 - 635.
- HASAN, I. A. G.; EL TINAY, A.H. 1995. Effect of fermentation on tannin content and *in-vitro* protein and starch digestibility of two sorghum cultivars. *Food Chem.* 53: 149 - 151.
- HERRERA-SALDANA, R. E.; HUBER, J. T.; POORE, M. H. 1990. Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. *J. Dairy Sci.* 73: 2386-2393.
- HERVÁS, G.; FRUTOS, P., SERRANO, E.; MANTECÓN, A. R.; GIRÁLDEZ, F. J. 2000. Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *J. Agric. Sci.* 135: 305 – 310.
- HERVÁS, G.; FRUTOS, P.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R.; ÁLVARES DEL PINO, M. C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Tech.* 109: 65 - 78.
- HINDERS, R. G.; ENG, K. 1971. Starch availability of various grain sorghums. *J. Anim. Sci.* 33: 285 – 286.
- HIBBERD, C. A.; WAGNER, D. G.; SCHEMM, R. L.; MITCHELL, E. D. Jr.; HINTZ, R. L.; WEIBEL, D. E. 1982 a. Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grain. *J. Anim. Sci.* 55: 665-672.
- HIBBERD, C. A.; WAGNER, D. G.; SCHEMM, R. L.; MITCHELL, E. D. Jr.; WEIBEL, D. E.; HINTZ, R. L. 1982 b. Digestibility characteristics of isolated starch from sorghum and corn grain. *J. Anim. Sci.* 55: 1490 – 1497.
- HIBBERD, C. A.; WAGNER, D.G.; HINTZ, R. L.; GRIFFIN, D.D. 1985. Effect of sorghum grain variety and reconstitution on site and extent of starch and protein digestion in steers. *J. Anim. Sci.* 61: 702 - 712.
- HILL, T. M.; SCHMIDT, S. P.; RUSSELL, R. W.; THOMAS, E. E.; WOLFE, D. F. 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.
- HINMAN, D. D.; JOHNSON, R. R. 1974. Influence of processing methods on digestion of sorghum starch in high concentrate beef cattle rations. *J. Anim. Sci.* 39: 417 - 422.
- HORNECK, A.D.; MILLER, R.O. 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In: Kalra, Y. P. (ed). *Handbook of reference methods for plant analysis*. Soil and Plant Analysis, Inc. CRC Press, 1998. 300p.

- HOWARD, D.; KREBS, G. L.; VAN HOUTERT, M. 2002. The value of *Acacia saligna* as a source of feed for sheep. *Conservation Science W. Aust.* 4: 135 - 138.
- HUBBARD, J. E.; HALL, H. H.; EARLE, F. R. 1950. Composition of the component parts of the sorghum kernel. *Cereal Chem.* 27: 415 - 420.
- HUCK, G. L.; KREIKEMEIER, K. K.; BOLSEN, K. K. 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.
- HUNTINGTON, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75: 852 – 867.
- JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E. T. 1973. Relationship between tannin levels, rats growth, and distribution of proteins in sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 21: 692 - 696.
- JAMBUNATHAN, R., KHERDEKAR, M. S., STENHOUSE, J. W. 1992. Sorghum grain hardness and its relationship to mold susceptibility and mold resistance. *J. Agric. Food Chem.* 40:1403 -1408.
- JANSMAN, A. J. M. 1993. Tannins in feedstuff for simple stomached animals. *Nutri. Res. Rev.* 6: 209 – 236.
- JONES, D. E. 1965. Banana tannin and its reaction with polyethylene glycols. *Nature.* 206: 299-300.
- JONES, W.T.; MANGAN, J.L. 1977. Complexes of condensed tannins of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein. and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J. Sci. Food. Agric.* 28:126-136.
- JUAN, N. A.; PORDOMINGO, A. J.; VELILLA, S. M.; JOULI, R. R. 1998. Utilización de sorgo conservado con urea para engorde de vaquillonas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18: 48 – 49.
- KHAZAAL, K.; BOZA, J.; ØRSKOV, E. R. 1994. Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean Browne: a comparison between the use of the in vitro gas production technique with or without insoluble polyvinilpyrrolidone or nylon bag. *Anim. Feed Sci. Tech.* 49: 133-149.
- KONDO, M.; KITA, K.; YOKOTA, H. 2004. Feeding value to goats of whole-crop oat ensiled with green tea waste. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 113: 71 - 81.
- KOTARSKI, S. F.; WANISKA, R. D.; THURN, K. K. 1992. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. *J. Nutrition.* 122: 178 - 190.
- KRUEGER, W. K.; GUTIERREZ-BAÑUELOS, H.; CARSTENS, G. E.; MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; GOMEZ, R. R.; ANDERSON, R. C.; KRUEGER, N. A.; FORBES, T. D. A. 2010. Effects of dietary tannin soured on performance,

feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Anim. Feed Sci. Techn.* 159: 1 – 9.

KUMAR, R.; SINGH, M. 1984. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 32: 447 - 453.

KUMAR, R.; VAITHIYANATHAN, S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Anim. Feed Sci. Techn.* 30: 21 – 38.

LANDAU, S.; SILANIKOVE, N.; NITSAN, Z.; BARKAI, D.; BARAM, H.; PROVENZA, F.D.; PEREVOLOTSKY, A. 2000. Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 69: 199 - 213.

LANDAU, S.; XUE, B.; DVASH, L.; FIREDMAN, S.; MABJEESH, S. J. 2002. Polyethylene glycol, used to alleviate the negative effects of dietary tannins, can also serve as a marker of fecal output in goats. *Small. Rum. Res.* 48: 37 - 43.

LEINMULLER, E.; STEINGASS, H.; MENKE, K. 1991. Tannins in ruminants feedstuff. *Anim. Res. Develop.* 33: 9 – 62.

MAGALHÃES, P.C.; RODRIGUES, W.A. ; DURÃES, F.O. 1997. Tanino no grão de sorgo. Bases fisiológicas e métodos de determinação. EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Circular Técnica Nº 27. 26 p.

MAKKAR, H. P S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Review Small Rum. Res.* 49: 241-256.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER. K. 1996. Effect of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. *J. Agric. Food Chem.* 44:1291-1295.

MAKKAR, H.P.S.; BLUEMMEL, M.; BECKER, K. 1995 a. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins. and their implication in gas productions and true digestibility in vitro techniques. *Br. J. Nutr.* 73:897-913.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; ABEL, H. J.; SZEGLETTI, C. 1995 b. Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentative processes in the RUSITEC. *J. Sci. Food Agric.* 69: 481 – 500.

MAKKAR, H.P.S.; SINGH, B. 1993. Effect of storage and urea addition on detannification and in sacco dry matter digestibility of mature oak (*Quercus incana*) leaves. *Anim. Feed Sci. Tech.* 41:247-259.

MARTÍNEZ SÁEZ, S. J.; GONZÁLEZ PÉREZ, C. E.; LEÓN GONZÁLEZ, M.; PEDRAZA OLIVERA, R.; LOYOLA HERNÁNDEZ. O. 2008. Uso de

PEG4000 para evaluar la influencia de los polifenoles en la producción de gas *in vitro* con heces vacunas como inóculo. *Zootecnia Trop.* 26: 261-264.

MARTINEZ, T. F.; MC ALLISTER, T. A. ; WANG, Y. ; REUTER, T. 2006. Effects of tannic acid and quebracho tannins on *in vitro* ruminal fermentation of wheat and corn grain. *J. Sci. Food Agric.*, 86:1244 -1256.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 321 – 330.

MAXSON, W. E.; SHIRLEY, R. L.; BERTRAND, J. E.; PALMER, A. Z. 1973. Energy values of corn, bird-resistant and non-bird-resistant sorghum grain in rations fed to steers. *J. Anim. Sci.* 37:1451-1457.

McALLISTER, T. A. ; PHILLIPPE, R. C. ; RODE, L. M. ; CHENG, K. J. 1993. Effect of the protein matrix on digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 71:205-212.

McALLISTER, T. A.; BAE, H. D.; DRAKE, C. L.; BRENT, B. E. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72: 3004-3018.

McCOLLOUGH, R. L.; RILEY, J. G.; DRAKE, C. L.; BRENT, B. E. 1972a. Feeding value of seven hybrids grain sorghums and two hybrids corns. *J. Anim. Sci.* 35:270 (Abstr.).

McCOLLOUGH, R. L.; DRAKE, C. L.; ROTH, G. M. 1972b. Feedlot performance of eight hybrid sorghum grains and three hybrid corns. In: Proc. 59th Annu. Cattlemen's Day. Bull. #557. p. 15 - 43. Kansas Agr. Exp. Sta., Manhattan.

McCOLLOUGH, R. L. 1973. Summary of feedlot performance and digestibilities of steers fed 13 hybrid sorghum and 2 hybrid corn grains. In: Proc. 60th Annu. Cattlemen's Day. Bull. #568. p. 51. Kansas Agr. Exp. Sta., Manhattan.

McGINTY, D. D.; RIGGS, J. K. 1968. Variation in digestibility of sorghum grains varieties. *J. Anim. Sci.* 27: 1170.

McLEOD, M. N. 1974. Plant tannins –Their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and reviews.* 44: 803-812.

McNABB, W. C.; PETERS, J.S.; FOO, L. Y.; WAGHORN, G. C.; JACKSON, S. J. 1998. Effect of condensed tannins prepared from several forage on the *in vitro* precipitation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rubisco) protein and its digestion by trypsin (EC2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1). *J. Sci. Food Agric.* 77: 201-212.

McNEILL, J. W.; POTTER, G. D.; RIGGS, J. K.; ROONEY, L.W. 1975. Chemical and physical properties of processed sorghum grain carbohydrates. *J. Anim. Sci.* 40:335-341.

McSWEENEY, C.S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D. 1999. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the

- tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3075-3083.
- McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; McNEILL, D. M.; KRAUSE, D. O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Anim. Feed Sci. Tech. 91: 83-93.
- MEISSNER, H. H.; SMUTS, M. E.; LANGSTON, O. K.; PAULSMEIER, D. V. 1995. The relationships between feed intake, daily gain and feed efficiency in fast-growing feedlot steers. Symposium: Intake by feedlot cattle. Oklahoma Agricultural Experiment Station – Division of Agricultural Sciences and Natural Resources Oklahoma State University. pp 49 – 55.
- MILLER, F. R.; LOWREY, R. S.; MONSON, W. G.; BURTON, G. W.; CRUZADO, H. J. 1972. Estimates of dry matter digestibility differences in grain of some *Sorghum bicolor* (L.) Moench varieties. Crop Sci. 12:563-566.
- MITARU, B. N. ; REICHERT, R. D.; BLAIR, R. 1983. Improvement of the nutritive value of high tannin sorghums for broiler chickens by high moisture storage (reconstitution). Poultry Sci. 62: 2065-2072.
- MITARU, B. N.; REICHERT, R. D.; BLAIR, R. 1984 a. Kinetics of tannin deactivation during anaerobic storage and boiling treatments of high tannin sorghums. J. Food Sci., 49: 1566 - 1568.
- MITARU, B. N. ; REICHERT, R. D. ; BLAIR, R. 1984 b. Nutritive value of reconstituted sorghum grains for weanling pigs. J. Anim. Sci. 58: 1211-1215.
- MITARU, B.N.; REICHERT, R. D.; BLAIR, R. 1984 c. The binding of dietary protein by sorghum tannins in the digestive tract of pigs. J. Nutr. 114: 1787- 1796.
- MONTIEL, M. D. 2003. Digestión ruminal del grano de sorgo en vacunos. Efectos del genotipo y del procesamiento. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 103 p.
- MONTIEL, M. D.; ELIZALDE, J. C.; GIORDA, L.; SANTINI, F. 2005. Effects of adding polyethylene glycol 4000 or urea to high tannin high moisture sorghum grain on ruminal degradation in beef cattle. J. Anim. Sci., 83, Suppl. 1/ J. Dairy Sci., 88, Suppl. 1: 305-306.
- MONTIEL, M. D.; DEPETRIS, G. J.; SANTINI, F. J.; CHICATÚN, A; VILLARREAL, E. L. 2006. Performance of feedlot heifers fed with high-tannin high moisture sorghum treated with urea compared with high moisture corn. J. Anim. Sci., 84, Suppl. 1/ J. Dairy Sci., 89, Suppl. 1: 219.
- MONTIEL, M.D; ELIZALDE, J. C.; SANTINI, F.; GIORDA, L. 2011. Características físicas y químicas del grano de sorgo. Relación con la degradación ruminal en bovinos. Arch. Zootec. 60:533-541.
- MUELLER-HARVEY, I. 2006. Unraveling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. J. Sci. Food Agric. 86: 2010 – 2037.

- NEUCERE, N. J.; SUMRELL, G. 1980. Chemical composition of different varieties of grain sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 28: 19 - 21.
- NEUHAUS, V.; TOTUSEK, R. 1971. Factors affecting the *in vitro* digestibility of high moisture sorghum grain. *J. Anim. Sci.* 33: 1321 - 1326.
- NOCEK, J. E. 1985. Evaluation of specific variables affecting *in situ* estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *J. Anim. Sci.* 60: 1347 - 1358.
- NOCEK, J. E. 1988. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *J. Dairy Sci.* 71: 2051-2069.
- NOCEK, J. E.; ENGLISH, J. E. 1986. *In situ* degradation kinetics: evaluation of rate determination procedure. *J. Dairy Sci.*, 69: 77 - 87.
- O'BRIEN, L. 1999. Genotype and environment effect on feed grain quality. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 703 - 719.
- OPATPATANAKIT, Y.; KELLAWAY, R. C.; LENA, I. J.; ANNISON, G.; KIRBY, A. 1994. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. *Aus. J. Agric. Res.* 45: 1247 - 1263.
- OSMAN, M. A. 2004. Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and *in vitro* protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation. *Food Chem.* 88: 129 - 134.
- ØRSKOV, E. R.; SAMRT, R.; MEHREZ, A. Z. 1974. A method of including urea in whole grains. *J. Agric. Sci. Camb.* 83: 299 - 302.
- OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 75: 868-879.
- PALMER, B.; JONES, R. 2000. The effect of PEG addition *in vitro* on dry matter and nitrogen digestibility of *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala* leaf. *Anim. Feed Sci. Tech.* 85:259-268.
- PARRA, V. F. 2004. Efecto del grado de procesamiento y del momento de cosecha del grano sobre la degradabilidad ruminal de tres híbridos de maíz. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 86p.
- PEREZ-MALDONADO, R. A.; NORTON, B. W.; KERVEN, G. L. 1995. Factors affecting *in vitro* formation of tannin-protein complexes. *J. Sci. Food Agric.* 69: 291 - 298.
- PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. 1997. Influence of genotype and stage of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 68: 25 - 35.

- PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. 1998. Influence of genotype and ensiling of corn on *in situ* degradation of starch in the rumen. J. Dairy Sci. 81: 2178-2184.
- PHILIPPEAU, C. ; LANDRY, J. ; MICHALET-DOREAU, B. 1998. Influence of the biochemical and physical characteristics of the maize grain on ruminal starch degradation. J. Agric. Food Chem. 46: 4287 - 4291.
- PHILIPPEAU, C. ; LE DESCHAULT DE MONREDON, F.; MICHALET-DOREAU, B. 1999. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. J. Anim. Sci. 77:238-243.
- PIRES, D. A. A. 2007. Avaliação de quatro genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor*) com a sem taninos nos grãos para a produção de silagens. Tesis para optar por el grado de Doctor en Zootecnia. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil. 107 p.
- PORDOMINGO, A. J.; JUAN, N. A. 2000. Grano de sorgo conservado con urea: efecto del partido sobre su potencial de engorde. Rev. Arg. Prod. Anim. 20: 91 - 92.
- PRICE, M. L.; BUTLER, L. G.; ROGEL, J. C.; FEATHERSTON, W. R. 1979. Overcoming the nutritionally harmful effects of tannin in sorghum grain by treatment with inexpensive chemicals. J. Agric. Food Chem. 27: 441 - 445.
- PRIOLO, A.; LANZA, M.; BELLA, M.; PENNISI, P.; FASONE, V.; BIONDI, L. 2002. Reducing the impact of condensed tannins in a diet based on carob pulp using two levels of polyethylene glycol: lamb growth, digestion and meat quality. Anim. Res. 51: 305 - 313.
- REICHERT, R. D.; FLEMING, S. E.; SCHAWAB, D. J. 1980. Tannin deactivation and nutritional improvement of sorghum by anaerobic storage of H₂O-, HCl-, or NaOH- treated grain. J. Agric. Food Chem. 28: 824 - 829.
- REINA, V.; OJEDA, A.; GONZALEZ, R.; COLMENARES, O. 2007. Efecto de la adición de polietilenglicol sobre la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica y contenido de energía metabolizable en granos de once cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*). Zootecnia Trop. 25: 157-165.
- RIFFEL, S. L. 2007. Contenido de taninos en el grano húmedo de sorgo y su efecto sobre la cinética de degradación y respuesta animal en vacunos. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 91p.
- RIGGS, J. K.; MCGINTY, D. D. 1970. Early harvested and reconstituted sorghum grain for cattle. J. Anim. Sci. 31: 991-995.
- RODRIGUEZ, M. N.; Borges, A. L. C. C.; Nogueira, F. S.; Gonçalves, L. C.; Borges, I. 1999. Silagem de sorgo de porte baixo, com diferentes teores de tanino e de umidade no colmo. IV- Influência dos taninos sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 51, n. 6. [en línea]

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09351999000600013&lng=en&nrm=iso [consulta 15 Mar. 2005].

- ROMERO, L. A.; COMERÓN, E. A.; BRUNO, O. A.; CASTILLO, A. R.; GAGGIOTTI, M. C. 2001. High moisture sorghum grain silage: effects of tannin content and urea treatment on the performance of dairy cows. 19th International Grassland Congress Brazilian Society of Animal Husbandry Sociedade Brasileira de Zootecnia. ID#19-24.
- ROONEY, L. W. 2005. Ten myths about tannins in sorghums. [en línea] <<http://www.icrisat.org/journal/cropimprovement/v1i1/ismn46/v1i1ten.pdf>>. [consulta: 15 septiembre 2005]
- ROONEY, L. W.; CLARCK, L. E. 1968. The chemistry & processing of sorghum grain. *Cereal Sci. Today*. 13: 259-286.
- ROONEY, L. W.; MILLER, F. R. 1981. Variation in the structure and kernel characteristics of sorghum. Proceedings of the international symposium on sorghum grain quality. ICRISAT Center, Patancheru, India. 143-162.
- ROONEY, L. W.; PFLUGFELDER, R. L. 1986. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J. Anim. Sci.* 63:1607-1623.
- ROWE, J. B.; CHOCT, M.; PETHICK, D. W. 1999. Processing cereal grains for animal feeding. *Aust. J. Agric. Res.* 50:721-736.
- RUSSELL, R.W.; LOLLEY, J.R. 1989. Deactivation of tannin in high tannin milo by treatment with urea. *J. Dairy Sci.*, 72: 2427-2730.
- RUSSELL, R.W.; LIM, J. C. M.; THOMAS, E. E.; MORA, E. C. 1988. Preservation of high-moiture milo with urea: grain properties and animal acceptability. *J. Amin. Sci.* 66: 2131 - 2139.
- SABA, W. J. ; HALE, W. H.; THEURER, B. 1972. *In vitro* rumen fermentation studies with a bird resistant sorghum grain. *J. Anim. Sci.* 35: 1076 - 1082.
- SCHAFFERT, R. E.; LECHTENBERG, V. L.; OSWALT, D. L.; AXTELL, J. D.; PICKETT, R. C.; RHYKERD, C. L. 1974. Effect of tannin on in vitro dry matter and protein disappearance in sorghum grain. *Crop. Sci.* 14: 640 - 643.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21 - 40.
- SALAWU, M. B.; ACAMOVIC, T.; STEWART, C. S.; HOWELL, F. D. D. 1997 a. Quebracho tannins with or without Browse Plus (a commercial preparation of polyethylene glycol) in sheep diets: effects on digestibility of nutrients *in vivo* and degradation of grass hay in sacco and *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69: 67 – 78.
- SALAWU, M. B.; ACAMOVIC, T.; STEWART, C.S.; HOWELL, F.D.D.; McKAY, I. 1997 b. Assessment of the nutritive value of *Calliandra calothyrsus*: *in sacco*

degradation and *in vitro* gas production in the presence of Quebracho tannins with or without Browse plus. *Anim. Feed Sci. Tech.* 69: 219 – 232.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAN, S. S; 1989. Dietary tannins: consequences and remedies. CRC Press. INC. Boca Raton. Florida. 208p.

SANDOVAL CASTRO, C. A.; MAGAÑA SEVILLA, H.; CAPETILLO LEAL, C.; DEB HOVELL, F. D. 2003. Comparison of charcoal and polyethylene glycol (PEG) for neutralizing tannin activity with an *in vitro* gas production technique. [en línea] <<http://bsas.org.uk/downloads/mexico/038.pdf>> [consulta: 15 de diciembre 2005].

SAS/STAT ®. 2009. User's Guide. Versión 9.2. Second Edition. Cary. NC: SAS Institute Inc. 7886 p.

SCHAFFERT, R. E., LECHTENBERG, V. L., OSWALT, D. L., AXTELL, J. D., PICKET, R. C., RHYKERD, C. L. 1974. Effect of *in vitro* dry matter and protein disappearance in sorghum grain. *Crop. Sci.* 14: 640 - 643.

SCHNEIDER, B. H. Y W. P. FLATT. 1975. The evaluation of feeds through digestibility experiments. The University of Georgia Press, Athens, G.A., U.S.A. 423 p.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. M., PELL, A. N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21- 40.

SHIRLEY, B. W. 1998. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci. Res.* 8:415 - 422.

SILANIKOVE, N., TAGARI, H., SHKOLNIK, A. 1993. Comparison of rate of passage, fermentation rate and efficiency of digestion of high fiber diet in desert Bedouin goats as compared to Swiss Saanen goats. *Small Ruminant Res.* 12: 45 - 60.

SILANIKOVE, N., NITSAN, Z. Y A. PEREVOLOTSKY. 1994. Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Ceratonia siliqua*) by sheep. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2844 - 2847.

SILANIKOVE, N., SHINDER, D., GILBOA, N., EYAL, M., NITSAN, Z. 1996a. Binding of poly(ethylene glycol) to samples of forage plants as an assay of tannins and their negative effects on ruminal degradation. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3230 - 3234.

SILANIKOVE, N., GILBOA, N., NIR, I., PEREVOLOTSKY, A. Y Z. NITSAN. 1996b. Effect of daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus* and *Ceratonia siliqua*) by goats. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 199 - 205.

SILANIKOVE, N., SHINDER, D., GILBOA, N., EYAL, M., NITSAM, Z. 1996c. Polyethylene glycol binding to plant samples as an assay for the biological effects of tannins: predicting the negative effects of tannins in

- Mediterranean browse on rumen degradation. *J. Agric. Chem. Food Sci.* 44: 3230 - 3234.
- SILANIKOVE, N., GILBOA N. Y Z. NITSAN. 1997. Interactions among tannins, supplementation and polyethylene glycol in goats given oak leaves: effects on digestion and food intake. *Anim. Sci.*, 64: 479 - 483.
- SILANIKOVE, N., PEREVOLOTSKY, A., PROVENZA, F. D. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91: 69 - 81.
- SIMPSON, E. J. Jr., SCHAKE, L. M., PFLUGFELDER, R. L., RIGGS, J. K. 1985. Evaluation of moisture uptake, aerobic and anaerobic phases of reconstitution upon sorghum grain digestibility and performance of steers. *J. Anim. Sci.* 60: 877 - 882.
- SMITH, A. H., ZOETENDAL, E., MACKIE, R. I. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecol.* 50: 197 – 205.
- SPENCER, C. M., CAI, Y., MARTIN, R., GAFFNEY, S. H., GOULDING, P. N., MAGNOLATO, D., LILLEY, T. H., HASLAN, E. 1988. Polyphenol complexation: some thoughts and observations. *Phytochemistry.* 27: 2397-2409.
- SNIFFEN, C., THOMAS, E., ALLSHORE, R., KRAMER, S., MAJEWSKI, C. 1996. What's new in fiber and carbohydrates. [en línea]. <<http://www.ansi.cornell.edu/tmplobs/baalU7cpb.pdf>> [Consulta: 03 septiembre 2005].
- STOCK, R. A., MADER, T. 1987. Grain processing for beef cattle. . [en línea]. <<http://www.ianr.unl.edu/pubs/beef/g136.htm>> [Consulta: 15 mayo 2002].
- STOCK, R. 1999. Nutritional benefits of specialty grain hybrids in beef feedlot diets. *J. Anim. Sci.* 77, Suppl. 2: 208.
- STREETER, M. N., WAGNER, D. G., HIBBERD, C. A., MITCHELL, E. D. Jr., OLTJEN, J. W. 1990 a. Effect of variety of sorghum grain on digestion and availability of dry matter and starch *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 29: 279-287.
- STREETER. M. N.; WAGNER. D. G.; HIBBERD. C. A.; OWENS. F. N. 1990 b. The effect of sorghum grain variety on site and extent of digestion in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 68:1121-1132.
- STREETER, M. N., WAGNER, D. G., HIBBERD, C. A., OWENS, F. N. 1990c. Comparison of corn with four sorghum grain hybrids: site and extent of digestion in steers. *J. Anim. Sci.* 68:3429-3440.
- STREETER, M. N., WAGNER, D. G., OWENS, F. N., HIBBERD, C. A. 1991. The effect of pure and partial yellow endosperm sorghum grain hybrids on site and extent of digestion in beef steers. *J. Anim. Sci.* 69:2571-2584.

- SULLINS, R. D., ROONEY, L. W. 1971. Physical changes in the kernel during reconstitution of sorghum grain. *Cereal Chem.* 48: 567-575.
- SULLINS, R. D., ROONEY, L. W. 1974. Microscopic evaluation of the digestibility of sorghum lines that differ in endosperm characteristics. *Cereal Chem.* 51:134-142.
- SULLINS, R. D., ROONEY, L. W. 1975. Light and scanning electron microscopic studies of waxy and nonwaxy endosperm sorghum varieties. *Cereal Chem.* 52:361-366.
- SWELL, H. B. 1993. Sorghum grain for beef cattle rations. Agricultural publication G02055. [en línea] <<http://www.feedbarnstore.com/animalscience/beef/G02555.PDF>> [consulta: 04 junio 2007].
- TAYLOR. J.. BEAN. S. R.. IOERGER. B. P.. TAYLOR. J. R. N. 2007. Preferential binding of sorghum tannins with γ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirin digestibility and biodegradation. *J. Cereal Sci.* 46:22 - 31.
- TEETER, R. G., SARANI, S., SMITH, M. O., HIBBERD, C. A. 1986. Detoxification of high tannin sorghum grains. *Poultry Sci.* 65: 67-71.
- THEURER, C. B. 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 63: 1649-1662.
- TILLEY, J. M. A., TERRY, R. A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. British Grassl. Soc.* 18: 104 – 111.
- VAN BARNEVELD, S. L. 1999. Chemical and physical characteristics of grains related to variability in energy and amino acid availability in ruminants: a review. *Aust. J. Agric. Res.*, 50:651-666.
- VANDERLIP, R. L., REEVES, H. E. 1972. Growth stages of sorghum [*Sorghum bicolor*, (L.) Moench.]. *Agron. J.* 64: 13-16.
- VAN SOEST, P. J. 1994. Carbohydrates. In: Nutritional ecology of the ruminant (2nd Ed). Cornell Univ. Press, Ithaca, NY. 476pp.
- VANZANT, E. S., COCHRAN, R. C., TITGEMEYER, E. C. 1998. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.* 76: 2717-2729.
- VICENTE, F., SARRACECA, A., DE VEGA, A. Y J. A. GUADA. 2004. Performance of several Cr and Yb analytical techniques applied to samples of different biological origin (digesta or faeces). *J. Sci. Food Agric.* 84:2035-2040.
- WAGHORN, G. C. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production. Progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 116 – 139.

- WAGHORN, G. C.; SHELTON, L. D.; McNABB, W. C.; McCUTCHEON, S. N. 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. J. Agric. Sci. 123: 109 – 119.
- WAICHUNGO. W. W.. HOLT. D. I. 1995. Use of ammonium hydroxide to reduce the level of assayable tannin in high-tannin sorghum grain. J. Agric. Food Chem. 43:728-732.
- WALDO, D. R. 1973. Extent and partition of cereal grains starch digestion in ruminants. J. Anim. Sci. 37:1062-1073.
- WANISKA, R. D. 2000. Structure, phenolic compounds, and antifungal proteins of sorghum caryopses. Pag. 72-106. In: Technical and Institutional Options for Sorghum Grain Mold Management: Proceeding of an International Consultation, 18-19 May 2000, ICRISAT, Patancheru, India (Chandrashekar, A., Bandyopadhyay, R., and Hall, A. J., eds.). 299 p.
- WARE, D. R., SELF, H. L., VETTER, R. L., HOFFMAN, M. P. 1977. Effects of storage system on the chemical character and utilization of sorghum grain by steers. J. Anim. Sci. 45: 1415-1425.
- WESTER, T. J., GRAMLICH, S. M., BRITTON, R. A., STOCK, R. A. 1992. Effect of grain sorghum hybrid on *in vitro* rate of starch disappearance and finishing performance of ruminants. J. Anim. Sci. 70: 2866 – 2876.
- ZAVALETA DE LUCIO, E. 1976. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. Ciencias Veterinarias. 1: 223-240.