ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo II, 627-629

UTILIZACIÓN DE DIFERENTES ESTÁNDARES PARA EL ANÁLISIS DE TANINOS CONDENSADOS EN ESPECIES VEGETALES

M. Álvarez del Pino, G. Hervás, F.J. Giráldez, A.R. Mantecón y P. Frutos
Estación Agrícola Experimental (CSIC) Apdo. 788 – 24080 León

INTRODUCCIÓN

Muchas especies vegetales consumidas por los rumiantes contienen cantidades de taninos, básicamente condensados (TC), que pueden modificar su utilización digestiva. El análisis de estos compuestos es, por lo tanto, fundamental para poder estimar su valor nutritivo.

Uno de los métodos más aceptados para la cuantificación del contenido de TC en especies vegetales es el del butanol en medio ácido (butanol-HCl). Los resultados obtenidos utilizando dicho método tienen que ser comparados con un estándar y expresados en función de éste (Porter et al., 1986; Terril et al., 1992; Perez-Maldonado y Norton, 1996).

El compuesto más utilizado como estándar externo para los TC es el tanino comercial de quebracho (extraído de arbustos del género *Schinopsis*). Este producto es una mezcla compleja de taninos condensados y otros compuestos, fundamentalmente fenoles simples, y necesita ser purificado antes de su uso.

No obstante, debido a la enorme variación de los TC dependiendo de su origen (peso molecular, composición química, estructura, etc.), no existe ningún estándar general de aplicación universal y el uso de estándares externos (quebracho, catequinas, etc.), puede sobrestimar o subestimar el contenido real de taninos. Por ello, últimamente se ha sugerido que sería conveniente utilizar estándares internos, es decir, aquellos obtenidos mediante la purificación de los taninos extraídos de la propia planta objeto de estudio. De esta forma, se podrían seleccionar compuestos más homogéneos y con un margen de propiedades más estrecho (Giner-Chávez et al., 1997; Schofield et al., 2001).

Sin embargo, esta alternativa añadiría aún más complejidad a la técnica por lo que, antes de efectuar recomendaciones, es importante evaluar los resultados obtenidos con los diferentes estándares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron muestras de cuatro especies arbustivas: *Erica arborea* y *Erica australis* (familia *Ericaceae*), y *Cytisus cantabricus* y *Genista occidentalis* (familia *Leguminoseae*).

De cada especie se tomaron muestras de tres individuos elegidos al azar, las cuales fueron inmediatamente congeladas y posteriormente liofilizadas. A continuación se llevó a cabo la separación morfológica manual de los tallos, hojas y flores de cada planta. Todas las muestras se molieron a 1 mm.

La extracción secuencial de los taninos libres, los ligados a la proteína y los ligados a la fibra se realizó siguiendo el método desarrollado por Terrill et al. (1992), con las modificaciones de Perez-Maldonado y Norton (1996). Los taninos libres se extrajeron con una solución de acetona al 70% y ácido ascórbico, después de haber eliminado, mediante éter dietílico y acetato de etilo los pigmentos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular que pudieran interferir en el análisis. Para la

extracción de los taninos ligados a la proteína se utilizó una solución de dodecil sulfato sódico (DSS), trietanolamina y 2-mercaptoetanol, que rompe los complejos tanino-proteína,. Por último, la cantidad de taninos que permanece en el residuo final, tras varios lavados con metanol y butanol, representa la fracción de taninos ligados a la fibra.

El análisis colorimétrico de los extractos de taninos libres, ligados a la proteína y ligados a la fibra se realizó según el método del butanol-HCl, descrito por Porter et al. (1986) y modificado por Terrill et al. (1992). Este método se basa en la despolimerización y posterior oxidación de los taninos condensados al ser sometidos a ebullición con butanol-HCl.

Como estándar externo se empleó un extracto comercial de taninos condensados de quebracho (*Roy Wilson Dickson. LTD.* Reino Unido) y como estándar interno, los taninos libres extraídos de la propia especie vegetal. En ambos casos (quebracho y taninos de cada planta), la purificación se realizó utilizando un gel de filtración Sephadex LH-20 y siguiendo las indicaciones de Hagerman (1991).

Se prepararon dos rectas de calibración para cada estándar: una para la determinación de los taninos libres y los ligados a la fibra (donde el disolvente utilizado fue el metanol) y otra para los taninos ligados a la proteína (donde se utilizó la solución DSS).

Los datos del contenido de taninos según los distintos estándares se compararon mediante una *t* de Student (SAS, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión del contenido de taninos condensados en función de un estándar externo (taninos de quebracho) o interno (taninos extraídos de la propia planta) dio lugar, en todos los casos, a valores significativamente distintos ($p<0,001$).

En las ericáceas (*E. arborea* y *E. australis*), los contenidos fueron siempre superiores ($p<0,01$) cuando se expresaron en "equivalentes de quebracho". Estas diferencias se repitieron en todas las fracciones (taninos libres, ligados a proteína, ligados a fibra y totales). Es interesante destacar que, exceptuando los valores correspondientes a los tallos, los contenidos de taninos condensados obtenidos en función del quebracho no parecen tener ningún sentido desde el punto de vista biológico: es prácticamente imposible que un tejido vegetal pueda contener un 72,66% de taninos.

Los valores observados en las dos leguminosas estudiadas (*G. occidentalis y C. cantabricus*) fueron, por el contrario, generalmente más elevados ($p<0,01$) cuando se expresaron en función de su estándar interno. En este caso, como puede observarse en la tabla adjunta, las mayores diferencias se encontraron en la fracción de taninos ligados a proteína de la especie *C. cantabricus*. Aunque en los pocos trabajos encontrados en la literatura en los que se utilizan estándares externos e internos, se indica que, en las especies estudiadas, el empleo del quebracho sobreestima el contenido de TC (debido a la baja reactividad de los taninos de quebracho frente al butanol-HCl y, consecuentemente, la elevada pendiente de su recta patrón), no tiene por qué resultar extraño que, existiendo en la naturaleza taninos más activos que los del quebracho, puedan existir también otros menos activos. En este sentido, sí se han encontrado referencias de subestimación del contenido de taninos con otros estándares externos, como la catequina (van Hoven y Furstenburg, 1992), la cianidina o la delfinidina (Giner-Chavez et al., 1997).

La disparidad entre los resultados obtenidos con los dos tipos de estándares estudiados podría deberse a diferencias entre la estructura y composición química de los taninos de quebracho y los de cada especie vegetal. Por consiguiente, asumiendo que el estándar interno presenta la estructura y composición química de los taninos de su especie, se puede considerar que los valores obtenidos según este estándar reflejan, de manera más exacta, el contenido real de taninos condensados (Giner-Chávez et al., 1997; Schofield et al., 2001).

Por lo tanto, de acuerdo con esta asunción, y comparando los valores obtenidos con los distintos estándares, se podría concluir que no es aconsejable la utilización del quebracho, como estándar externo, cuando se busca una cuantificación precisa del contenido de taninos condensados.

Tabla 1. Contenido de taninos condensados libres (TCL), taninos condensados ligados a la proteína (TCP), taninos condensados ligados a la fibra (TCF) y taninos condensados totales (TCT) (g/100 g MS) según un estándar externo, quebracho (que), y el estándar interno extraído de cada especie (int).

		TCL		TCP		TCF		TCT	
Especie		int	que	int	que	int	que	Int	que
E. arborea	Flores	10,83	66,60	2,49	5,75	0,05	0,32	13,37	72,66
	Hojas	6,34	39,12	1,92	4,40	0,06	0,40	8,32	43,91
	Tallos	2,62	16,40	1,47	3,34	0,04	0,23	4,13	16,97
Dif (que-int)		34,1(±6,14)		2,5(±0,24)		0,3(±0,03)		36,9(±6,35)	
E. australis	Flores	7,89	43,10	4,69	8,4	0,10	0,52	12,68	52,02
	Hojas	8,83	48,19	2,43	4,34	0,06	0,35	11,32	52,88
	Tallos	2,68	14,82	2,36	4,22	0,06	0,32	5,10	19,35
Dif (que-int)		28,9(±4,60)		2,5(±0,31)		0,3(±0,04)		31,7(±4,74)	
C. cantabricus	Flores	1,06	0,26	11,96	0,88	0,27	0,09	13,29	1,23
	Hojas	0,99	0,24	9,10	0,68	0,31	0,10	10,40	1,02
	Tallos	0,98	0,24	5,00	0,38	0,27	0,09	6,25	0,71
Dif (que-int)		-0,8(±0,02)		-8,0(±1,04)		-0,2(±0,01)		-9,0(±1,05)	
G. occidentalis	Flores	0,05	0,12	0,44	0,26	0,01	0,03	0,50	0,41
	Hojas	0,07	0,17	0,51	0,30	0,01	0,04	0,59	0,51
	Tallos	0,08	0,20	0,41	0,24	0,01	0,03	0,5	0,47
Dif (que-int)		0,1(±0,01)		-0,2(±0,01)		0,02(±0,001)		-0,1(±0,02)	

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Giner-Chavez, B.I.; Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lascano,C.; Reed, J.D.; Pell, A.N. (1997). *J. Sci. Food Agric.* 74: 359-368.

Hagerman, A.E. (1991). Miami University. Oxford. OH. USA.

Pérez-Maldonado, R.A.; Norton, B.W. (1996). *Br. J. Nut.* 76: 515-533.

Porter, L.J.; Hrstich, L.N.; Chan B.G. (1986). *Phytochemistry* 25: 223-230.

S.A.S. (1989). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Schofield, P.; Mbugua, D.M.; Pell, A.N. (2001). *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21-40.

Terrill, T.H.; Rowan, A.M.; Douglas, G.B.; Barry, T.N. (1992). *J. Sci. Food Agric.* 58: 321-329.

van Hoven, W.; Furstenburg, D. (1992). *Comp. Biochem. Phys.* 2: 381-385.