

Revisión

Metodologías para el estudio de compuestos polifenólicos en especies forrajeras: Un enfoque histórico

Danny E. García^{1*} y María G. Medina²

RESUMEN

Mediante la revisión de las publicaciones científicas más representativas sobre la bioquímica de los taninos, se presentan los principales resultados relacionados con sus propiedades beneficiosas y antinutricionales a partir de estudios químico-analíticos, *in vitro* e *in vivo*. Se tratan los acápites de mayor relevancia y se describe la repercusión de los conocimientos adquiridos sobre estos compuestos, en el desarrollo de estrategias viables de alimentación. Históricamente, hasta que la química de los productos naturales no se desarrolló cuantitativamente, los estudios de nutrición animal con fuentes forrajeras fenólicas fueron incipientes. Los primeros ensayos realizados con posterioridad a 1950 estuvieron encaminados a la caracterización fitoquímica de las fuentes mayoritarias de taninos y la determinación de la actividad biológica de los principales grupos, haciendo énfasis en las leguminosas forrajeras como recurso suplementario por excelencia. En una segunda etapa se implementaron y validaron las técnicas analíticas que se utilizarían para describir el efecto deletéreo de los polifenoles y su interacción con los metabolitos primarios y secundarios. Se postularon las concentraciones

¹ Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Central España Republicana, Perico. CP 44 280. Matanzas, Cuba. *Correo electrónico: danny.garcia@indio.atenas.inf.cu

² Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Estación Experimental de Pampanito, Trujillo. Venezuela.

Recibido: 01/08/05 Aceptado: 09/09/05

críticas en las cuales estos compuestos podían afectar el buen funcionamiento digestivo de los rumiantes y los monogástricos y se comparó la acción detrimental de los taninos condensados e hidrolizables en diferentes condiciones de alimentación, determinando las variables de mayor influencia en su acción toxicológica. Independientemente a que las investigaciones realizadas hasta el presente han aportado mucha información en cuanto a las características de los taninos vegetales, en la actualidad existen temas importantes tales como, los mecanismos relacionados con el efecto antihelmíntico, la función ecológica de los taninos hidrolizables en las especies no leguminosas y la interacción de los polifenoles con los alcaloides entre otros, que no han sido abordados con fuerza; por lo que se precisaron estudios integrales para dilucidar estas apremiantes incógnitas.

Palabras clave: Polifenoles, taninos condensados, taninos hidrolizables, factores antinutricionales, alimentación animal.

Review

Methodologies for the study of polyphenolic compounds in forage species: A historic review

SUMMARY

By means of the representative scientific publications review on the tannin biochemistry, the main results related to their beneficial and antinutritional properties from chemistry-analytical, *in vitro* and *in vivo* studies were presented. The paragraphs are greater relevance and the repercussion of the knowledge acquired on these compounds is described; in the development of viable strategies of feeding. Historically, until the chemistry of natural products was not developed quantitatively, the animal nutrition studies with phenolic forages sources were insufficient. The first tests made after 1950 were directed to the phytochemical characterization of the majority tannin sources and the determination of the biological activity of the main groups with particular emphasis in fodder leguminous like additional resource of nutrients. In one second stage the analytical techniques were implemented and validated that would be used to describe the polyphenols antifeedant effect and its interaction with the primary and secondary metabolites. The critical concentrations, in which these compounds could affect the gastric digestive process of ruminants and monogastric were postulated. Besides, the detrimental action of tannins hydrolysables and condensed in different conditions of feeding was compared, determining the variables of greater

influence in the toxicological action. Independently to that the investigations made until the present have contributed much information as far as the characteristics of vegetal tannins, at the present time exists important subjects such as, the mechanisms related to the antihelmintic effect, the ecological function of hydrolysables tannins in non leguminous species and the interaction of polyphenols with alkaloids; among others, that have not been boarded with force; reason why integral studies need to explain these urgent questions.

Key words: Polyphenols, condensed tannins, hydrolysable tannins, antinutritional factors, animal feeding.

INTRODUCCIÓN

Consideraciones iniciales

El tema relacionado con las implicaciones negativas de los taninos; así como los estudios derivados de sus propiedades bioquímicas son, aún en nuestros días, permanentes. Estas investigaciones son extremadamente polémicas y en muchos casos las conclusiones a las cuales se han arribado muestran incongruencias; por lo que sin lugar a dudas, constituye la especialidad de la fitoquímica aplicada a la nutrición animal de la cual se ha escrito con mayor énfasis en los últimos treinta años.

Dado el elevado número de estudios realizados, los disímiles objetivos trazados por las líneas del pensamiento científico y la contrastante relación estructura/actividad de los principales grupos de taninos, ha sido extremadamente difícil llegar a criterios integradores que ayuden a la comprensión de sus características pro-antinutricionales. El desarrollo paulatino en el conocimiento de los polifenoles de origen vegetal, basados en estudios bioquímicos de nutrición animal, ha sido inconstante. No obstante, en muchas investigaciones se han realizado importantes descubrimientos.

Por tales motivos esta revisión bibliográfica tuvo como objetivo esencial describir el desarrollo evolutivo en los estudios de alimentación con fuentes tánicas, haciendo énfasis solamente en las investigaciones más representativas y que por su contenido, a criterio de los autores, clásicamente han proporcionado aportes sustanciales, cambios de paradigmas en la

temática o constituyen etapas significativas en el desarrollo del conocimiento de la actividad biológica de estos importantes metabolitos secundarios.

Historia

Desde épocas remotas los taninos han sido utilizados empíricamente en la conservación de materiales de origen animal por el hecho de "transformar" las pieles en objetos más resistentes y duraderos. Recientemente se ha comprobado que culturas legendarias, tales como la egipcia y la china, empleaban polifenoles naturales para retardar o inactivar la descomposición microbiana de los alimentos y los preparados medicinales y religiosos.

Todas estas evidencias históricas describen la estrecha relación entre el desarrollo de las civilizaciones y la utilización de extractos tánicos como herramienta para su bienestar y desenvolvimiento cotidiano. Los taninos son macromoléculas naturales pertenecientes al grupo de los polifenoles que son sintetizados por numerosas especies vegetales. Estas estructuras se diferencian del resto de los fenoles por presentar elevado peso molecular y precipitar esencialmente las proteínas; debido a la disminución de la solubilidad en el complejo que forma.

Desde comienzos del siglo XX los taninos se convirtieron en el foco de atención de la comunidad científica relacionada con los productos naturales, debido a su amplia distribución en las especies botánicas de mayor valor alimentario para animales y humanos.

El desarrollo de las investigaciones con polifenoles se aceleró sustancialmente por la aparición de la fitoquímica como rama de la química y la evolución en los estudios sistemáticos de clasificación quimiotaxonómica, los métodos de detección, extracción y purificación de fenoles; así como la implementación del análisis químico orgánico como herramienta fundamental en la elucidación de estructuras complejas (De Marciano y Hasegawa, 1991).

Si bien hasta el año 1950 solo se contaban con estudios aislados en relación a algunas fuentes naturales de taninos y experimentos de actividad farmacológica, a partir de la segunda mitad del siglo pasado con el desarrollo de la síntesis de los productos naturales, la utilización extensiva de la espectroscopía infrarroja (IR), ultravioleta visible (UV), la resonancia

magnética nuclear (RMN) (Willimas y Fleming, 1966; Highet y Sokoloski, 1975), los primeros pasos en la comprensión de los procesos de biosíntesis del metabolismo secundario (Bernfeld, 1967) y los métodos cromatográficos (Browning, 1969) las investigaciones bioquímicas con taninos no pasaron a un nivel superior.

A partir de ese momento la literatura científica reúne numerosas informaciones relacionadas con estructuras tánicas pero con un carácter estrictamente orientado hacia la ciencia básica sin describir, de manera aplicada, las implicaciones desde el punto de vista nutricional. En el año 1963 se publicó uno de los primeros trabajos sobre estudios bioquímicos en la evaluación *in vitro* de forrajes para la alimentación animal (Tilley y Terri, 1963). Esta técnica se empleó posteriormente con mucho éxito en la determinación de la actividad antinutricional de algunos metabolitos polifenólicos.

Principales investigaciones en el siglo XX

Contrariamente a lo que se podría esperar, los taninos hidrolizables (TH) fue el primer grupo de compuestos que se investigó intensivamente. En este sentido Haslam (1965) incursionó en el estudio de los galoil ésteres de la familia Aceraceae y se pretendió cuantificar, mediante métodos analíticos, los contenidos de TH basados en principios estables de reacción con sales inorgánicas. Dichos resultados sirvieron como elementos de partida en el conocimiento de las macromoléculas polifenólicas complejas.

Algunos años después Bate-Smith (1973) profundizó en el estudio de los taninos condensados (TC) presentes en algunas leguminosas como fuentes importantes de forraje, determinando la gran variabilidad interespecífica; así como los principales patrones en el ensayo del nbutanol/HCl/Fe³⁺ como método de cuantificación novedoso en la década. Esta investigación constituyó uno de los primeros trabajos donde se integró armónicamente algunos de los factores que, más adelante, resultaron ser cruciales para la comprensión de las funciones biológicas de los taninos.

En ese mismo período otros resultados relevantes lo constituyeron la utilización del nitrito de sodio (NaNO₂) e Iodato de potasio (KIO₃) para la determinación de elagitaninos basado en la hidrólisis de los ésteres del ácido hexahidroxifenico en presencia de piridina como solvente típico y la

determinación de galotaninos y elagitaninos en especies del género *Acer* (Bate-Smith, 1977).

Por su parte, Broadhurst y Jones (1978) utilizaron el método de la Vainillina/HCl para la cuantificación de metadifenoles de manera rutinaria y en ese mismo año Price *et al.* (1978) realizaron una intensa crítica de protocolo, sustentado en las diferencias de coloración de los monómeros y los polímeros de TC y la sobrestimación de las concentraciones en algunas fuentes forrajeras ricas en flavonoides. Fue la primera ocasión en que se disertó con fuerza sobre las limitaciones de los métodos fitoquímicos para taninos, en la caracterización de las fuentes de alimento animal y sus implicaciones analíticas.

Seguidamente, Hagerman y Butler (1978) emplearon la propiedad biológica por excelencia de los taninos (precipitantes de proteínas) para la estimación de los niveles polifenólicos en la biomasa comestible. Esto constituyó la primera ocasión en que un método químico de cuantificación describía la capacidad astringente de estos compuestos. Un año más tarde Menke *et al.* (1979) estimaron la digestibilidad y la energía metabolizable mediante la producción de gas *in vitro*. Dicho protocolo serviría como procedimiento básico de partida para el acoplamiento con técnicas analíticas que describirían el efecto deletéreo de los taninos de mayor distribución natural.

La década del 80 constituyó el verdadero cambio cualitativo en las investigaciones nutricionales con taninos. En este sentido, Hagerman y Butler (1980) reanudaron los estudios de cuantificación de taninos totales (TT) por el procedimiento de precipitación con la fracción V de la albúmina de suero bovino (BSA) en un considerable número de especies; pero esta vez usando marcaje isotópico con Iodo (^{125}I) mediante conteo electromagnético sensible. Esta investigación si bien, fue la primera en emplear los radioisótopos estables para determinar la actividad precipitante de los taninos, no consideraba algunos aspectos medulares de bioseguridad y la implementación del protocolo se encarecía debido a los elevados costos de los reactivos y los equipos.

Seguidamente en 1981 se incursionó en la comprensión de la interacción proteína-tanino, donde los mismos autores estudiaron la regioespecificidad de las uniones macromoleculares de los TC con las estructuras secundarias y terciarias de proteínas séricas químicamente puras.

(Hagerman y Butler, 1981). Este fue el primer experimento, en condiciones controladas, donde se pudo demostrar que la interacción de los taninos con las moléculas nitrogenadas seguía un patrón estequiométrico racional y que dicha propiedad repercutía fuertemente en la actividad biológica del metabolito; así como en la fisiología digestiva del animal que lo consumía.

Al año siguiente, Butler *et al.* (1982) lograron modificar el solvente en el ensayo de la Vainillina/HCl para estimar el grado de polimerización de los TC extractables. Sin lugar a dudas fue la primera vez en que se trató de mejorar un procedimiento analítico con el propósito de determinar el peso molecular de los taninos y su posible influencia en las propiedades beneficiosas o perjudiciales en el sistema digestivo.

Paralelamente con estos resultados, Orskov (1982) estandarizó el procedimiento para medir los niveles de proteína microbiana remanente en la técnica de digestibilidad *in vitro* (procesos de liofilización del material); factor de suma importancia en los ensayos de estimación de las propiedades antinutritivas de los taninos.

Dos años más tarde, Larwence *et al.* (1984) estudiaban el rol de los TC y su implicación en el valor nutritivo de alimentos para animales utilizando polietilenglicol (PEG-4000); compuesto químico que, de manera novedosa, se comenzaba a utilizar en pruebas *in vivo* con ruminantes por el hecho de presentar una elevada afinidad por los taninos y ser inocuo para los animales en experimentación.

Posteriormente, Reed *et al.* (1985) explotaron la posibilidad de cuantificar polifenoles totales (PT) en forrajes mediante la precipitación con Acetato de Iterbio tetrahidratado ($\text{Yb}(\text{AcO})_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$) por el hecho de no requerir patrones químicos específicos que pudieran traer consigo diferencias numéricas en los análisis por gravimetría clásica. Esta investigación fue la primera en enfocar la necesidad de implementar métodos sencillos y precisos para la cuantificación de un gran número de muestras de forrajes, y tratar de expresar los resultados de diferentes analistas mediante un mismo protocolo experimental. No obstante, en la actualidad, la comparación de los datos provenientes de diferentes autores continúa siendo una problemática; ya que se siguen empleando métodos analíticos con características disímiles.

En ese año también se estudió la relación de los taninos presentes en la biomasa comestibles, con otros metabolitos secundarios con probada

acción anticualitativa (Freeland *et al.*, 1985). En este sentido se demostró que la presencia de saponinas, en algunas fuentes vegetales, abolían el efecto antinutricional de los TC y que la liberación de ácido cianhídrico (HCN), proveniente de los glucósidos cianogénicos, también podía inhibirse con la presencia de TT en determinadas condiciones ecológicas (Goldstein y Spencer, 1985).

Un año después, Barry *et al.* (1986) comenzaron a dilucidar el papel de los TC en la dieta de los rumiantes, específicamente en la digestión de los carbohidratos solubles y las proteínas, mediante el acomplejamiento de los polifenoles con PEG-4000. Este experimento demostró que los TC podían también interactuar con los hidratos de carbono y disminuir su utilización efectiva.

Por su parte, Nicholson *et al.* (1986) esclarecieron, por primera vez, el mecanismo de acción de los taninos clásicos en *Colletotrichum graminicola*; así como las implicaciones en la patogenicidad del hongo en condiciones naturales de propagación. Este descubrimiento constituyó el primer trabajo en el cual se informó el efecto fungicida de los TC, se conocieron los procesos bioquímicos asociados a dicha actividad y se demostró concisamente que los taninos vegetales presentaban inequívocamente funciones defensiva contra los patógenos foliares en la mayoría de las leguminosas forrajeras.

Conjuntamente, Porter *et al.* (1986) realizaron pruebas colorimétricas para lograr establecer conversiones analíticas confiables para la cuantificación rutinaria de TC basados en el coeficiente de extinción molar de los monómeros más comunes. Estos cálculos se realizaron ya que inicialmente la gran diversidad de patrones analíticos para expresar los resultados, proporcionaban lecturas muy contrastantes en los ensayos establecidos de manera previa. La publicación de este método constituye, en la actualidad, una referencia obligada para aquellos investigadores que incursionan en la determinación de TC en alimentos para animales y humanos.

Independientemente se desarrolló un procedimiento espectrofotométrico para la cuantificación de purinas como marcadores importantes de la relación masa microbiana/proteína, como complemento de la cromatografía de alta resolución (HPLC) para la estimación de la actividad biológica de los TC (Zinn y Owens, 1986).

En 1987 se continuaron los estudios sobre la capacidad de precipitación de los taninos; pero haciendo énfasis en la cantidad de proteína precipitada por unidad de fenol (g BSA/g PT) como criterio cuantitativo relevante (Makkar *et al.*, 1987). Esta técnica se basó en algunas modificaciones realizadas con anterioridad, y su mayor novedad radicó en que la proteína de prueba se solubilizaba en una solución detergente (SDS) y posterior se cuantificaba con un reactivo específico y sensible (Ninhidrina). Los resultados que derivaron del ensayo ayudaron a comprender, en su momento, que los taninos de una misma subfamilia química, con características estructurales muy similares, podían reaccionar de manera extremadamente disímil con los mismos analíticos. De esta manera se pudo establecer que la relación g BSA/g PT era el indicador más viable para describir la afinidad particular de cada tanino, y que a su vez correlacionaba fuertemente con las propiedades deletéreas de estos compuestos.

Como transformación al procedimiento anterior, pero sustentado en el mismo principio del método, Hagerman (1987) desarrolló el protocolo de la difusión radial en fase sólida. Mediante la técnica se obtenían resultados similares a las cuantificaciones realizadas en medio líquido, solo que se necesitaba un gel de agarosa y algunos materiales adicionales. Por otra parte se prescindía de un instrumento costoso y no siempre accesible en todos los laboratorios (espectrofotómetro UV). Este método sirvió como complemento en la comprobación de las propiedades químico-físicas de los taninos y moduló, desde el punto de vista biológico, las propiedades astringentes de los TC en monogástricos y rumiantes.

Así mismo, Price *et al.* (1987) obtuvieron avances importantes en el conocimiento de los efectos conjugados de las saponinas con los TT en la absorción intestinal, y se comprobó lo dañino que podían resultar las concentraciones elevadas de TC y TH en los órganos internos del ganado. Esta investigación ayudó a establecer las semejanzas y diferencias existentes en la acción detrimental de los grupos de taninos y su tiempo de vida media en los animales en condiciones *in vivo*; factores que no han sido retomados con posterioridad en las investigaciones de fisiología digestiva y que presenta una vital importancia en la comprensión de la relación beneficio/riesgo en la alimentación con fuentes taníferas.

Por su parte, Mueller-Harvey *et al.* (1987) emplearon exitosamente la cromatografía de capa delgada (TLC) para caracterizar las particularidades estructurales de los PT, TC y TH mediante la combinación de reactivos

cualitativos selectivos en las leguminosas. Fue la primera ocasión en que, mediante la combinación del HPLC y un procedimiento sencillo, se pudo determinar las diferencias fitoquímicas existentes entre especies con características similares.

El año 1988 fue el más prolífero en cuanto a aportes sustanciales en las pruebas bioquímicas con taninos. Al respecto, se extendió el método microcuantitativo de determinación de la capacidad precipitante a condiciones rutinarias (Dawra *et al.*, 1988). Inoue y Hagerman (1988) modificaron un procedimiento para la determinación de TH mediante el desarrollo de color con Rodanina. También se obtuvo la primera dinámica microbiológica ruminal asociada a concentraciones variable de TH y se llevó a cabo el estudio más integral en la época sobre la variabilidad en los niveles de TC y TH, el grado de polimerización y su estrecha relación con la capacidad de precipitación de proteínas (Makkar *et al.*, 1988a,b). Esta investigación estableció que, para lograr establecer de manera integral la verdadera acción detrimental de los taninos, los estudios no podían centrarse solamente en la cuantificación de sus concentraciones, y que necesariamente se requerían estudios en los cuales se determinara la interacción polifenol-microorganismo, la naturaleza de los compuestos acompañantes, las particularidades macroestructurales y los resultados de los bioensayos de simulación.

Un hecho singular lo constituyó el descubrimiento del nexo entre la concentración de los taninos con el incremento de la madurez de la biomasa en *Quersus incana*, una leguminosa templada con probado potencial forrajero (Makkar *et al.*, 1988a). En dicha investigación se logró demostrar que los niveles de TT no permanecían estáticos en la fitomasa y que a su vez, las concentraciones se encontraban relacionadas negativamente con los procesos naturales de senescencia. En el estudio se llegó a la conclusión de que al aumentar la edad de las hojas, los TC presentes aumentan el grado de polimerización y, por ende, disminuyen sus propiedades antinutricionales.

Posteriormente, Makkar *et al.* (1989) relacionaron los parámetros de degradabilidad ruminal y los niveles de fibra con los contenidos de taninos en especies de interés alimentario, llegando a la conclusión que los polifenoles de la fracción fibrosa (ligninas) también presentaban una importante significación biológica en la interacción con los animales herbívoros. Por otro lado, se publicó la reseña más completa sobre los métodos químicos de precipitación de proteínas, en la cual se describieron

cualitativos selectivos en las leguminosas. Fue la primera ocasión en que, mediante la combinación del HPLC y un procedimiento sencillo, se pudo determinar las diferencias fitoquímicas existentes entre especies con características similares.

El año 1988 fue el más prolífero en cuanto a aportes sustanciales en las pruebas bioquímicas con taninos. Al respecto, se extendió el método microcuantitativo de determinación de la capacidad precipitante a condiciones rutinarias (Dawra *et al.*, 1988). Inoue y Hagerman (1988) modificaron un procedimiento para la determinación de TH mediante el desarrollo de color con Rodanina. También se obtuvo la primera dinámica microbiológica ruminal asociada a concentraciones variable de TH y se llevó a cabo el estudio más integral en la época sobre la variabilidad en los niveles de TC y TH, el grado de polimerización y su estrecha relación con la capacidad de precipitación de proteínas (Makkar *et al.*, 1988a,b). Esta investigación estableció que, para lograr establecer de manera integral la verdadera acción detrimental de los taninos, los estudios no podían centrarse solamente en la cuantificación de sus concentraciones, y que necesariamente se requerían estudios en los cuales se determinara la interacción polifenol-microorganismo, la naturaleza de los compuestos acompañantes, las particularidades macroestructurales y los resultados de los bioensayos de simulación.

Un hecho singular lo constituyó el descubrimiento del nexo entre la concentración de los taninos con el incremento de la madurez de la biomasa en *Quersus incana*, una leguminosa templada con probado potencial forrajero (Makkar *et al.*, 1988a). En dicha investigación se logró demostrar que los niveles de TT no permanecían estáticos en la fitomasa y que a su vez, las concentraciones se encontraban relacionadas negativamente con los procesos naturales de senescencia. En el estudio se llegó a la conclusión de que al aumentar la edad de las hojas, los TC presentes aumentan el grado de polimerización y, por ende, disminuyen sus propiedades antinutricionales.

Posteriormente, Makkar *et al.* (1989) relacionaron los parámetros de degradabilidad ruminal y los niveles de fibra con los contenidos de taninos en especies de interés alimentario, llegando a la conclusión que los polifenoles de la fracción fibrosa (ligninas) también presentaban una importante significación biológica en la interacción con los animales herbívoros. Por otro lado, se publicó la reseña más completa sobre los métodos químicos de precipitación de proteínas, en la cual se describieron

todas las ventajas y limitaciones de las técnicas para la determinación de TC; así como sus implicaciones en la biología nutricional (Makkar, 1989). Estos dos últimos trabajos dieron a conocer, de forma precisa, los efectos detrimentales más comunes de los TC y las particularidades de los métodos, elementos esenciales que no estaban totalmente esclarecidos hasta ese momento.

En la última década del siglo pasado se realizaron los mayores aportes en el campo de la bioquímica nutricional con taninos. En ese sentido, se inició un creciente interés no solo a los niveles y a las características más determinantes de los taninos provenientes de las especies forrajeras típicas; sino también a los contenidos de los polifenoles presentes en los subproductos agroindustriales como una considerable fuente de material voluminoso para los rumiantes (Makkar *et al.*, 1990).

Por su parte, Lowry y Sumpter (1990) criticaron el método gravimétrico para la determinación de PT con Yb^{3+} debido a que el catión no reaccionaba cuantitativamente con algunos flavonoides (Rutina) y era inefectivo en especies con bajos contenidos de fenoles.

Makkar *et al.* (1991) publicaron el artículo más completo sobre los TT presentes en las especies del género *Quercus*; así como su relación con la edad del rebrote. Fue la segunda ocasión en que los autores postularon que, en sentido general, la edad en que las especies forrajeras presentaban un mejor valor nutritivo (máximos niveles de PC y mínima fracción fibrosa) contradictoriamente poseen los mayores contenidos de PT y TC.

Asimismo, Peng *et al.* (1991) describieron la insolubilidad de algunos elagitaninos (TH) presentes en la madera de plantas forrajeras, lo que sugirió la posibilidad de que no solo los TC pudieran estar unidos a los constituyentes de la pared celular de los vegetales. Desde ese año, en la literatura científica, no se ha publicado otra evidencia similar sobre la probable presencia de TH no extractables en los forrajes tropicales.

Más adelante, Makkar y Singh (1991) determinaron la concentración de los TC en la hojarasca y el material verde de la región aérea de plantas autóctonas. Este experimento demostró que el proceso de caída de las hojas los taninos se acumulan, mediante reacciones enzimáticas, en la fracción de carbohidratos insolubles (FF) y que los procesos de envejecimiento natural de la biomasa, afectaban drásticamente los contenidos de las estructuras

fenólicas. Dicho fenómeno había sido descrito, dos años antes, en las especies *Calliandra calorphyrsus* y *Gliricidia sepium* en las cuales, mediante pruebas de laboratorio, se indujo la deshidratación artificial (Ahn *et al.* 1997). También en esa etapa, Fish y Thompson (1991) describieron la interacción lectina-tanino como un complejo capaz de eliminar la acción detrimental de los polifenoles frente a la enzima L-amilasa en un experimento *in vitro*, demostrando que uno de los metabolitos secundarios de mayor actividad tóxica también podía presentar efectos positivos en la ecología digestiva.

En 1992 se publicaron numerosas investigaciones que aportaron una nueva visión sobre la importancia de los taninos y el desarrollo de técnicas colaterales para la estimación del valor nutritivo en alimentos para rumiantes. Al respecto, se optimizaron técnicas para la liofilización microbiana y la determinación simultánea de purinas en algunos bioensayos de acoplamiento (Yanh y Russell, 1992; Balcells *et al.*, 1992).

En otro orden, se profundizó en las características y la función de la TC en especies forrajeras del género *Acacia*, empleada ampliamente como modelo fitoquímico típico de las regiones áridas (Pritchard *et al.*, 1992), así como tres de las primeras investigaciones sobre la detoxificación de tanina (Makkar y Sing, 1992 a,b,c). Un resultado singular lo constituyó la predicción realizada por Hanley *et al.* (1992) sobre la digestibilidad de la PC y la MS con los niveles variantes de TC cuantificados por el método de la BSA. En este sentido, fue la primera vez en que se usaron modelos matemáticos específicos para generar ecuaciones aplicables a diferentes condiciones de alimentación.

Otro hecho singular resultó el reporte sobre la toxicidad aguda de los TH en los rumiantes, y los estudios de regionalización realizados por Garg *et al.* (1992). Mediante este último estudio se comprendió que no solo los TH podían ocasionar daños irreversibles en la ecología ruminal; sino que la hidrólisis de los TH podrían traer consigo también incidencias negativas en los animales poligástricos.

Con relación a los métodos de cuantificación, Terrill *et al.* (1992) desarrollaron un procedimiento colateral muy útil para la determinación de TC unidos a la PC y a los componentes fibrosos con solventes específicos. No obstante, el coeficiente de variación de los resultados mediante esta metodología dependía, en buena medida, de la matriz analítica ensayada y

necesitaba obligatoriamente campanas de extracción de gases debido a los olores desagradables de los componentes azufrados. Seguidamente, Mueller-Harvey y McAllan (1992) publicaron una reseña integral sobre las implicaciones nutricionales en la alimentación de los monogástricos y los rumiantes con fuentes tánicas, realizando un análisis exhaustivo sobre los protocolos más comunes de aplicación.

Por otra parte, Caygil y Mueller-Harvey (1999) disertaron sobre el efecto de factores de manejos tales como la fertilización y la edad de la planta, en los contenidos de PT y TC en algunas leguminosas templadas, además de referirse a la teoría de balance carbono-nitrógeno como principal hipótesis para explicar las transformaciones endógenas de los taninos. El principal logro de la investigación radicó en que, basado en los conocimientos clásicos sobre la biosíntesis de los metabolitos secundarios, se discutió sobre la relación directa de los compuestos nitrogenados de las especies vegetales con las rutas químicas derivadas del ácido shikímico como molécula precursora de todos las estructuras fenólicas.

En tanto, Makkar *et al.* (1993) correlacionaron los resultados de las cuantificaciones de TC entre los dos métodos analíticos más utilizados en los laboratorios de evaluación de alimentos (precipitación con polivinil polipirrolidona (PVPP) y con BSA); Makkar y Becker (1993a) estudiaron las posibles variantes de extracción en el procedimiento de la vainillina/HCl; se investigó sobre la inclusión de aditivos químicos (urea) y su efecto en el valor nutritivo de los forrajes con elevadas cantidades de TC (Makkar y Singh, 1993) y por último, se presentaron los resultados más novedosos sobre la variabilidad estructural de los TH con la fuente comercial (Makkar y Becker, 1993b).

Después de haber publicado una gran cantidad de investigaciones sobre la cuantificación de metabolitos fenólicos, Makkar y Becker (1994a) señalaron las principales limitaciones y logros de los ensayos de cuantificación de taninos, planteando estrategias viables de solución para los procedimientos que presentaban limitaciones prácticas. En ese sentido, los autores también describieron las etapas más importantes para el aislamiento de TC a partir de forrajes, que pudieran ser empleados como patrones para la realización de las curvas de calibración en los métodos fotométricos (Makkar y Becker, 1994b). Por otra parte se probó definitivamente que los TC no difundían hacia el torrente sanguíneo en el caso de los monogástricos (Terrill

et al., 1994); demostrando así que no ocurría la adsorción estomacal e intestinal en ninguno de los casos.

Más adelante, McAllister *et al.* (1994) comenzaron los estudios sobre la interacción de los TC con los microorganismos del rumen (*Fibrobacter succinogens*); demostrando el efecto inhibitorio de los taninos sobre dichos organismos y Makkar *et al.* (1994) demostraron que algunos taninos, de amplia distribución taxonómica, eran también degradados cuantitativamente por microorganismos comunes.

Se comenzó a profundizar sobre el perfil polifenólico de *Lotus pedunculatus* y *Lotus corniculatus* (forrajes de elevada distribución subtropical) y su repercusión en la fracción no nitrogenada y el metabolismo del plasma en ovinos; respectivamente (Waghorn *et al.*, 1994; Waghorn y Shelton, 1997). Estas leguminosas templadas sirvieron de modelo para las investigaciones en plantas tropicales, en etapas posteriores de investigación y se comenzaron a establecer, preliminarmente, límites críticos de TC en los cuales los metabolitos no causaban trastornos digestivos en los rumiantes.

Adicionalmente, Terrill *et al.* (1994) comenzaron a realizar estudios de digestión con carbono radiactivo (^{14}C). Estas pruebas fueron las primeras en concluir que los TC presentan adsorción post-ruminal y que su paso al torrente sanguíneo era poco probable. El experimento ayudó a comprender que la acción antinutricional de los TC en los rumiantes ocurre, esencialmente, por la inactivación enzimática y el desequilibrio poblacional de los organismos ruminales y no por desórdenes en el metabolismo sanguíneo.

Sobre esta problemática, pero en el caso de monogástricos, Jansman *et al.* (1994) descubrieron mecanismos de adaptación (secreción de la glándula parótidas) cuando se suministraban a las ratas dietas con elevados contenidos de taninos; demostrando que no solo los rumiantes son capaces de responder fisiológicamente ante la inclusión de fenoles tóxicos por vía oral.

Posteriormente, Makkar *et al.* (1995) describían los principales problemas en la determinación de la fracción fibrosa de los forrajes ricos en TC. También realizaron una valoración sobre las implicaciones de esta limitante en la determinación de parámetros digestivos, las fuentes más comunes de error; así como la validez de los resultados en estudios *in vitro*.

et al., 1994); demostrando así que no ocurría la adsorción estomacal e intestinal en ninguno de los casos.

Más adelante, McAllister *et al.* (1994) comenzaron los estudios sobre la interacción de los TC con los microorganismos del rumen (*Fibrobacter succinogens*); demostrando el efecto inhibitorio de los taninos sobre dichos organismos y Makkar *et al.* (1994) demostraron que algunos taninos, de amplia distribución taxonómica, eran también degradados cuantitativamente por microorganismos comunes.

Se comenzó a profundizar sobre el perfil polifenólico de *Lotus pedunculatus* y *Lotus corniculatus* (forrajes de elevada distribución subtropical) y su repercusión en la fracción no nitrogenada y el metabolismo del plasma en ovinos; respectivamente (Waghorn *et al.*, 1994; Waghorn y Shelton, 1997). Estas leguminosas templadas sirvieron de modelo para las investigaciones en plantas tropicales, en etapas posteriores de investigación y se comenzaron a establecer, preliminarmente, límites críticos de TC en los cuales los metabolitos no causaban trastornos digestivos en los rumiantes.

Adicionalmente, Terrill *et al.* (1994) comenzaron a realizar estudios de digestión con carbono radiactivo (^{14}C). Estas pruebas fueron las primeras en concluir que los TC presentan adsorción post-ruminal y que su paso al torrente sanguíneo era poco probable. El experimento ayudó a comprender que la acción antinutricional de los TC en los rumiantes ocurre, esencialmente, por la inactivación enzimática y el desequilibrio poblacional de los organismos ruminales y no por desórdenes en el metabolismo sanguíneo.

Sobre esta problemática, pero en el caso de monogástricos, Jansman *et al.* (1994) descubrieron mecanismos de adaptación (secreción de la glándula parótidas) cuando se suministraban a las ratas dietas con elevados contenidos de taninos; demostrando que no solo los rumiantes son capaces de responder fisiológicamente ante la inclusión de fenoles tóxicos por vía oral.

Posteriormente, Makkar *et al.* (1995) describían los principales problemas en la determinación de la fracción fibrosa de los forrajes ricos en TC. También realizaron una valoración sobre las implicaciones de esta limitante en la determinación de parámetros digestivos, las fuentes más comunes de error; así como la validez de los resultados en estudios *in vitro*.

Por otra parte, se llevó a cabo uno de los primeros experimentos integradores en el cual, bajo condiciones controladas, se determinó el efecto de algunas variables del ecosistema ruminal y las estructuras químicas de los taninos en la formación del complejo tanino-proteína. (Pérez-Maldonado *et al.*, 1995).

Otro hecho significativo lo constituyó la comparación entre las reacciones del PEG-4000 y la PVPP con los taninos (Makkar *et al.*, 1995a). Estos resultados fueron utilizados con posterioridad en el mejoramiento de los métodos analíticos para la determinación del efecto negativo y la separación cuantitativa de los TC; respectivamente.

Asimismo, se aisló y caracterizó la primera bacteria capaz de degradar los TH, resultado que tuvo mucho impacto en la comunidad científica; ya que hasta ese momento todos los esfuerzos investigativos habían estado centrados en la búsqueda de microorganismos capaces de metabolizar TC (Nelson *et al.*, 1995). También se comenzó a utilizar intensivamente la técnica de simulación ruminal (RUSITEC) con la que se pudo comprobar el efecto antinutricional de varias fuentes de alimento para rumiantes; así como la modulación de la interacción tanino-saponina mediante el ensayo de producción de gases (Makkar *et al.*, 1995; Makkar *et al.*, 1995b). Con estos estudios se logró comprobar que las saponinas, clásicamente identificadas como compuestos antinutricionales, también podrían presentar efectos positivos al combinarse con los polifenoles.

A partir de la investigación realizada por Degen *et al.* (1995), se le dio otra connotación a las leguminosas con elevados contenidos de taninos, pero esta vez como alimento principal en zonas con climas áridos y pobreza extrema. Posteriormente se publicó un trabajo sobre las implicaciones ecológicas de los taninos en el medio natural (Ruohomaki *et al.*, 1996) y el material más completo del quinquenio sobre los bioensayos con fenoles (Makkar y Becker, 1996).

Por su parte, Silanikova *et al.* (1996) y Silanikova *et al.* (1996) publicaron unos interesantes trabajos sobre la inclusión de PEG-4000 en pruebas metabólicas integrales con diversas alternativas de alimentación, llegando a la conclusión que no todas las fuentes polifenólicas ocasionaban los mismos efectos.

En otro orden de investigación, se estableció la necesidad de cuantificar indistintamente los contenidos de PT, TT, TC y TH como indicadores imprescindibles en la evaluación y selección de alimentos para animales tales como subproductos agroindustriales, forrajes convencionales y alternativos (Lamers *et al.*, 1996; Makkar *et al.*, 1996; Stienezen *et al.*, 1996). De igual manera, se investigó sobre las propiedades beneficiosas de los taninos mediante estudios de inhibición de biomarcadores de tumores cutáneos (Perchellet *et al.*, 1996) y se comenzó a utilizar la RMN-¹³C en el estudio de la degradación biológica de los taninos por hongos (Gamble *et al.*, 1996).

Otros resultados relevantes lo constituyó la determinación de los efectos de los TC en el pastoreo con especies leguminosas (Wang *et al.*, 1996), el efecto en la digestión de los carbohidratos en bovinos y caprina (Pérez-Maldonado y Norton, 1996), la posibilidad de degradación de complejo tanino-proteína por algunos microorganismos ruminales y la determinación de las especificidades en la interacción tanino-saponina (Blair *et al.*, 1996).

En 1997 se reanudaron las pruebas con PEG-4000 y TC en ensayos *in vivo* (Ben Salem *et al.*, 1997a,b), se disertó sobre los métodos cuantitativos de TC y TH con la misma importancia y profundización (Hagerman *et al.*, 1997) y se estimaron los contenidos de TC mediante la reacción con agentes químicos específicos (Matthews *et al.*, 1997). En esta investigación, mediante los estudios de los mecanismos en la sustitución electrofílica, los taninos de elevado peso molecular podían cuantificarse después de sus rupturas poliméricas.

Por otra parte, se comenzó a utilizar el espectro IR cercano (NIR) para la cuantificación de TC a frecuencias muy específicas (2 150 cm⁻¹) (Goodchild *et al.*, 1997) y Makkar *et al.* (1997) profundizaron en las relaciones fisiológicas entre la fracción polifenólica y otros metabolitos secundarios (saponinas y fitatos) con parámetros de valor nutritivo usando correlaciones para determinar la función ecológica en variedades de leguminosas.

Aunque ambos resultados constituyeron grandes avances en el entendimiento de la biología de los taninos, el empleo de ondas electromagnéticas largas y las correlaciones inter-metabólicas no han sido retomadas intensivamente en el siglo XXI.

Con relación a recopilaciones bibliográficas, Makkar *et al.* (1997a) publicaron el primer tratado sobre la técnica de producción de gas *in vitro* y su acoplamiento con las determinaciones de los taninos, como vía para la comprensión de su efecto detrimental. También, Makkar *et al.* (1997b) informaron que existían diferencias sustanciales entre la digestibilidad aparente y la verdadera cuando los forrajes contenían elevados niveles de taninos.

Por su parte, Makkar y Becker (1997a,b) demostraron que las proteínas ricas en el aminoácido Prolina constituyen las primeras líneas de defensa contra los taninos, en los ovinos alimentados con elevadas dosis de estos metabolitos y que los TC no extractables presentaban poca repercusión antinutricional, respectivamente. En tanto, Miller *et al.* (1997) comprobaron la posibilidad de obtener inóculos detanificantes a partir de rumiantes. Este resultado puso de manifiesto que, mediante manipulación biotecnológica, se podría obtener cultivos de microorganismos selectivos capaces de degradar compuestos anticuvalitativos en determinadas condiciones de producción. Un año después se discutió sobre las ventajas y limitaciones en el uso de técnicas *in vitro* para la estimación biológica de la actividad de los TC (Makkar *et al.*, 1998) y que, en todos los casos, no era evidente su acción antinutricional (Chiquette *et al.*, 1998).

Se publicaron investigaciones relacionadas con la significación nutricional de los TC unidos a la FF (TC-FF) y se comprobó principalmente que estos compuestos no extractables no presentan implicaciones nutricionales negativas (Getachew *et al.*, 1998). Mediante estudios de regionalización se demostró que las plantas adaptadas a condiciones estresantes de clima y suelo presentan mayor concentración de PT y actividad precipitante (Makkar y Becker, 1998); criterios que enfatizaron la función defensiva de los fenoles cuando las condiciones edafoclimáticas son adversas para las plantas. Adicionalmente, McSweeney *et al.* (1998) profundizaron en el conocimiento del efecto deletéreo conjugado de los TH en el valor nutritivo de otras leguminosas de uso común en el trópico.

Resumiendo algunos de los principales efectos de los taninos en la interacción con los animales herbívoros, los Cuadros 1a y 1b muestran la incidencia de los polifenoles de diversas especies forrajeras en los sistemas biológicos.

Cuadro 1a. Efecto de algunos compuestos polifenólicos en los sistemas biológicos.

Grupo de polifenol	Especie	Efecto	Referencia
Negativo			
TH	<i>Quercus incana</i>	Tóxico severo en rumiantes	Garg <i>et al.</i> (1992)
Tetrámero de TC	<i>Acacia melanoxylon</i>	Inhibe la actividad de la enzima proteína-quinasa	Polya y Foo (1994)
	<i>Athyrium filix-femina</i> <i>Vaccinium myrtillus</i>	Actividad alelopática, inhibe la germinación y la longitud de las plántulas acompañantes	Pellissier (1994)
Polifenoles simples	<i>Trifolium subterraneum</i>	Efecto estrogénico	Nwannenna <i>et al.</i> (1994)
	<i>L. corniculatus</i>	Interviene en el metabolismo de los aminoácidos y los sulfatos	Wang <i>et al.</i> (1994)
	<i>Quersus calliprinos</i> <i>Pistacia lentiscus</i> <i>Ceratonia siliqua</i>	Afecta el consumo y la digestión de los nutrimentos	Silanikove <i>et al.</i> (1996)
TC	<i>Calliandra calothyrsus</i>	Disminuye la digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS	Salawu <i>et al.</i> (1997)
	<i>L. corniculatus</i>	Reduce el consumo de MS y la digestión de los aminoácidos en el intestino delgado (5-6% MS)	Aerts <i>et al.</i> (1999)
	<i>Acacia aneura</i>		

En el mismo período se sugirieron valores de PC, TC y TH en las cuales las especies forrajeras podrían compararse en cuanto a su composición química (Aregheore *et al.*, 1998) estableciéndose así indicadores que describieran la calidad de cada fuente de alimento.

Adicionalmente se estudió la variabilidad en las concentraciones de los TC en especies de un mismo género, demostrando que las posibles variaciones en los patrones isoenzimáticos repercutían claramente en las rutas biosintéticas de los TC (McNeill *et al.*, 1998).

Cuadro 1b. Efecto de algunos compuestos polifenólicos en los sistemas biológicos.

Grupo de polifenol	Especie	Efecto	Referencia	
Positivo				
TC	<i>L. corniculatus</i>	Incrementa la velocidad de crecimiento y acelera la ovulación en cabras (2-4% MS)	Min <i>et al.</i> (1999)	
		Incrementa la producción de lactosa en la leche (4-5% MS)	Aerts <i>et al.</i> (1999)	
	<i>Acacia nilotica</i>	Efecto antihelmíntico en cabras	Kahiya <i>et al.</i> (2003)	
	<i>Acacia karoo</i> <i>Albizia anthelmintica</i> <i>Dichrostachys</i>	Efecto antihelmíntico en rumiantes menores y ratas	Githiori <i>et al.</i> (2003)	
PT y TT	<i>cinerea</i> <i>Cassia sieberiana</i>	Inhiben los biomarcadores de tumores <i>in vivo</i>	Perchellet <i>et al.</i> (1996)	
	Polifenoles simples	<i>Morus alba</i>	Actividad larvívica Induce la diferenciación de células humanas	Suck <i>et al.</i> (1997) Sun <i>et al.</i> (2000)
		<i>Albizia lebbeck</i>	Propiedades biosorbentes	Fernández <i>et al.</i> (1996)

Se realizó un extenso trabajo de clasificación fenotípica sobre las bacterias ruminales tolerantes a elevadas dosis de taninos (Nelson *et al.*, 1998) y se realizó la primera investigación en la cual, mediante técnicas biotecnológicas, se pudo comparar el efecto de los niveles contratantes de TC provenientes de un mismo forraje en parámetros digestivos.

Se mejoró la metodología para la cuantificación de TH con KIO_3 y se dilucidaron los mecanismos de precipitación de proteínas con los galotaninos y la epicatequina 4→8 (Willis y Allen, 1998; Hagerman *et al.*, 1998). Estos resultados demostraron que los TH como compuestos que estructuralmente no se formaban por condensaciones de flavonoides; sino mediante el acoplamiento de anillos de carbohidratos y fenoles simples, precipitaban igualmente las proteínas de las soluciones acuosas.

La última década del siglo XX constituyó la etapa cumbre en los estudios nutricionales con taninos. En este sentido se demostró, utilizando RMN, que mediante la estrategia de extracción de los TC-FF por el método

del nbutanol/HCl/Fe³⁺ no todos los TC se hidrolizaban cuantitativamente a partir de la fracción fibrosa (Makkar *et al.*, 1999). Esta investigación describió lo difícil que resulta el diseño de procedimientos analíticos que no presenten limitaciones prácticas en algunas de sus etapas. Se comenzaron a emplear los métodos que inicialmente habían sido diseñados para la cuantificación de tóxicos en alimentos para animales, en el control de la calidad de alimentos para humanos; lo que trajo consigo un aumento en la rigurosidad de los controles para los concentrados comerciales (Labarbe *et al.*, 1999).

Por su parte, Naurato *et al.* (1999) realizaron estudios sobre la interacción tanino-histatina (proteína de origen humano) demostrando patrones de acoplamiento similares a los ya conocidos en el caso de los roedores y los rumiantes. También se realizaron investigaciones paralelas con ratas y ovejas demostrando la existencia de cambios drásticos en el tejido y la utilización de los nutrientes por elevadas concentraciones de TC (Dawson *et al.*, 1999). Este experimento demostró que la acción detrimental de los polifenoles resulta común para todas las variantes de los sistemas digestivos.

Un logro sustancial lo constituyeron los primeros ensayos microbiológicos sobre la modulación de la ecología ruminal en animales alimentados con dietas con elevados niveles de TC, demostrando que el sistema microbiano-ruminal se adaptaba progresivamente para poder realizar un uso adecuado de las fuentes de nutrimentos (Odenyo *et al.*, 1999). Dichos resultados orientaron las investigaciones al estudio de las interacciones microbianas como clave imprescindibles en la comprensión de la acción de los taninos en los animales poligástricos.

Por otra parte, se comenzaron las investigaciones sobre el papel de los TC en los procesos de conservación de forrajes y se concluyó una etapa importante en las investigaciones con *Acacia cyanophylla* (Ben Salem *et al.*, 1999a,b). Con relación a eso, Hagerman *et al.* (1999) resaltaron la importancia de los taninos en el control de la proteína soluble de los ensilajes así como su repercusión en el mejor aprovechamiento de los efluentes producidos por la fermentación microbiana.

Finalmente, Makkar y Becker (1999) optimizaron la cuantificación de algunas bases nitrogenadas, en los bioensayos con taninos, mediante la utilización de la HPLC, con el propósito de estimar parámetros relacionados con su acción detrimental.

Investigaciones en los inicios del siglo XXI

En el nuevo milenio las investigaciones con PEG-4000 aportaron más información sobre el efecto de los TC en cuanto a la velocidad de producción de proteína microbiana, su relación con el nitrógeno endógeno y el metabolismo proteico en rumiantes con diversas fuentes tánicas (Getachew *et al.*, 2000a; McNeil *et al.*, 2000; Ben Salem *et al.*, 2000). Dichas investigaciones consolidaron los conocimientos adquiridos, en décadas anteriores, sobre el efecto de los taninos en la producción animal en diferentes partes del mundo.

Por su parte, Jones *et al.* (2000) promulgaron la selección de especies forrajeras teniendo en cuenta las propiedades positivas de los taninos así como sus características antinutricionales. Fue la primera ocasión en que los métodos de selección le confirieron importancia a la acción pronutricional de los taninos como una propiedad determinante.

Se estudió también la estequiometría en la producción de ácidos grasos volátiles en sistema *in vitro* con taninos (Getachew *et al.*, 2002); así como la producción de gas en sistema isoproteico y variantes de nitrógeno (Getachew *et al.*, 2000b). Estos mismos autores en investigaciones posteriores caracterizaron la cinética de fermentación y algunos parámetros de desarrollo microbiano en presencia de polifenoles conocidos (Getachew *et al.*, 2000c).

Con relación a estudios microbiológicos, Pell *et al.* (2000) probaron la tolerancia microbiana en diferentes especies de rumiantes con contenidos variables de taninos; así como los mecanismos probables para resistir la detoxificación (Brooker *et al.*, 2000). Estos estudios señalaron que ni los contenidos más elevados de TC resultaban letales si previamente los animales se adaptaban a consumir dietas con niveles crecientes de polifenoles.

En otro orden de investigaciones, se comenzó a promocionar la factibilidad de la inclusión en las dietas para humanos de macromoléculas fenólicas como mejoradoras de la salud (King, 2000) y se demostró que en determinados géneros de leguminosas, independientemente de la variabilidad cuantitativa con relación a los taninos, el patrón de actividad biológica se repetía claramente (Palmer y McSweeney, 2000).

Por otra parte, se publicó uno de los estudios más sólidos sobre el efecto antihelmíntico de los TC en rumiantes (Kahn y Díaz-Hernández, 2000), aunque en ninguna investigación relacionada con la temática se ha podido describir el mecanismo por el cual el conteo fecal de huevos (hpg) y la población de parásitos adultos en el tracto gastrointestinal disminuyen de manera abrupta.

En el año 2001 se publicaron las dos reseñas más completas sobre el desarrollo en las técnicas de cuantificación de TH (Mueller-Harvey, 2001) y TC (Schofield *et al.*, 2001); así como el empleo extensivo de la tiólisis para el análisis por HPLC de alimentos para humanos (Guyot *et al.*, 2001) y la metanólisis en el caso de los TH (Lei *et al.*, 2001). Adicionalmente se estudió el efecto pos-ingestivo de los TC y las saponinas en mediciones con PEG-4000 (Silanikova *et al.*, 2001), se describió exhaustivamente la interacción tanino-microorganismo desde el punto de vista biológico (McSweeney *et al.*, 2001) y se profundizó en el conocimiento de los procesos de degradación de los TC en el sistema digestivo de los animales monogástricos (Abia y Fry, 2001).

Un año más tarde, Hoffmann *et al.* (2002) realizaron la modificación más importante en la optimización de los ensayos biológicos de la capacidad precipitante de los taninos y Hartzfeld *et al.* (2002) prosiguieron con las cuantificaciones selectivas de TH con sales inorgánicas. Posteriormente, Henson *et al.* (2003) modificaron esta vez el procedimiento de la BSA con ^{125}I , mediante conteo gamma, para eliminar el procedimiento de la centrifugación y la manipulación del material radioactivo, aspectos que constituían una deficiencia de la técnica desde sus comienzos.

Finalmente, Makkar (2003), basado en los procedimientos establecidos por la Organización Internacional de Energía Atómica, publicó la guía más completa en el análisis químico de fenoles en los árboles y arbustos con potencial forrajero. Sin lugar a dudas, este material constituye la recopilación de 30 años de investigaciones intensivas en la búsqueda de procedimientos analíticos para la comprensión de la bioquímica de las macromoléculas polifenólicas.

Consideraciones finales

Si bien es cierto que el gran número de investigaciones con taninos han permitido conocer muchos aspectos de su naturaleza, función e

importancia, todavía en el primer quinquenio del nuevo siglo prevalecen muchas incógnitas que no han sido respondidas.

En este sentido, el Cuadro 2 muestra las temáticas más abordadas mundialmente, así como los acápites en los cuales se debe investigar con mayor énfasis para dilucidar algunos aspectos de vital importancia.

Cuadro 2. Principales investigaciones realizadas con taninos y estudios que requieren mayor profundización

Aspectos mayormente estudiados
<ul style="list-style-type: none"> - Cuantificación de PT, TT, TC Y TH en especies forrajeras y subproductos agroindustriales. - Determinación de la actividad biológica de los taninos mediante técnicas de análisis instrumental y pruebas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>. - Efecto de la suplementación y el tratamiento poscosecha en la disminución de la actividad antinutricional de los TC. - Utilización de métodos de conservación en la mejora del valor nutritivo de fuentes taníferas - Desarrollo, implementación y validación de técnicas analíticas para la estimación del perfil polifenólico en forrajes. - Estudio de la interacción TC-antinutriente y TC-metabolito primario.
Acápites que requieren mayor número de investigaciones
<ul style="list-style-type: none"> - Estudio de las potencialidades benéficas de los PT, TC y TH. - Repercusión nutricional y función biológica de los TC-FF y TH-FF en las leguminosas forrajeras. - Dilucidar los mecanismos relacionados con el efecto antihelmíntico de los TC. - Estudios <i>in vivo</i> con especies monogástricas y determinación de las concentraciones críticas de PT, TC y TH. - Determinación de las propiedades pro-nutricionales de la interacción TC-alcaloide. - Estudios biotecnológicos para la búsqueda de cepas resistentes a estructuras polifenólicas específicas. - Función ecológica de los TC y TH en las especies no leguminosas. - Papel de los TC y TH como disuasores del consumo voluntario en especies con gran diversidad de metabolitos secundarios.

CONCLUSIONES

En la segunda mitad del siglo XX y los primeros años del nuevo milenio se han llevado a cabo la mayor cantidad de estudios con taninos, debido fundamentalmente a que diversas líneas de investigación relacionadas con la alimentación animal y humana, la ciencia de los materiales, la farmacología, la cosmética y la medicina han descubierto, a partir de sus propiedades singulares, numerosos usos y beneficios.

El interés creciente en la comprensión de sus características pre-nutricionales/tóxicas ha derivado de la búsqueda de nuevos alimentos suplementarios para el ganado, fundamentalmente leguminosas tropicales y templadas como alternativas viables por su excelente composición química y elevado valor nutritivo: comparado con las gramíneas de pastoreo. Estos estudios básicos, realizados en la mayoría de los casos con especies animales adaptados a condiciones subtropicales, han aportado conocimientos prácticos para poder realizar un manejo más eficiente de los alimentos que por naturaleza, presentan considerables niveles de taninos.

La mayoría de las investigaciones de bioquímica nutricional y fisiología digestiva con fuentes tánicas se han llevado a cabo en países desarrollados, donde la disponibilidad de recursos e instrumentación constituyen limitantes en los laboratorios de evaluación de alimentos. No obstante, en Latinoamérica se deben continuar los ensayos para aclarar fundamentalmente, las propiedades beneficiosas de los taninos en la nutrición animal, determinar las características antinutricionales de los polifenoles presentes en las leguminosas de mayor distribución en el área y formular estrategias viables para aumentar la productividad ganadera basada en estas fuentes de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abia R. y S.C. Fry. 2001. Degradation and metabolism of ^{14}C -labelled proanthocyanidins from carob (*Cerotonia siliqua*) pods in the gastrointestinal tract of the rat. *J. Sci. Food Agric.*, 81: 1156-1165.
- Aerts R.J., T.N. Barry y W.C. McNabb. 1999. Polyphenols and agricultural: beneficial effect of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 75: 1-12.
- Ahn J., R. Elliott y B. Norton. 1997. Oven drying improves the nutritional value of *Calliandra calothyrsus* and *Gliricidia sepium* supplements for sheep given low. *J. Sci. Agric.*, 75: 503-510.
- Aregheore E.M., H.P.S. Makkar y K. Becker. 1998. Feed value of some browse plants from Central Zone of Delta State Nigeria. *Trop. Sci.* 38: 97-104.

- Balcells J., J.A. Guada y J.M. Peiró. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 575: 153-157.
- Barry T.N., T.R. Manley y S.J. Duncan. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Site of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentrations. *Brit. J. Nutr.*, 55: 132-137.
- Bate-Smith E.C. 1973. Tannin of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry*, 12: 1809-1812.
- Bate-Smith E.C. 1977. Astringent tannins of *Acer* species. *Phytochemistry*, 16: 1421-1427.
- Bernfeld P. 1967. *Biogenesis of Natural Products*. Pergamon Press
- Ben Salem H., A. Nefzaoui, H. Ferchichi, L. Ben Salem y J.L. Tisserand. 1997a. Intake and digestion in sheep given fresh or air-dried *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. *Ann. Zootech.*, 46: 361-374.
- Ben Salem H., A. Nefzaoui, L. Ben Salem y J.L. Tisserand. 1997b. Effect of *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage supply on intake and digestion by sheep fed on lucerne hay based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 68: 101-113.
- Ben Salem H., A. Nefzaoui, L. Ben Salem y J.L. Tisserand. 1999a. Intake digestibility, urinary excretion of purine derivatives and growth by sheep given fresh, air-dried or polyethylene glycol-treated of foliage of *Acacia cyanophylla* Lindl. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 78: 297-311.
- Ben Salem H., A. Nefzaoui, L. Ben Salem y J.L. Tisserand. 1999b. Different means of administering polyethylene glycol to sheep: effect on the nutritive value of *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 68: 809-818.
- Ben Salem H., A. Nefzaoui, L. Ben Salem y J.L. Tisserand. 2000. Deactivation of condensed tannin in feed block. Effect on feed intake, diet digestibility, nitrogen balance, microbial synthesis and growth by sheep. *Livest. Prod. Sci.*, 64: 51-60.
- Bhat T.K., H.P.S. Makkar y B. Singh. 1996. Degradation of tannin protein complexes by microorganisms present in faeces of oak-cattle. *Letters Appl. Microbiol.*, 22: 257-258.

- Broadhurst R.B. y W.T. Jones. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.*, 29: 788-794.
- Brooker J. D., L. Ódonovan, L. Skene y G. Sellick. 2000. Mechanisms of tannin resistance and detoxification in the rumen. *En Brooker J.D. (Ed) Tannins in Livestock and Human Nutrition. ACIAR Proceedings N° 92*, pp. 117-122.
- Browning D.R. 1969. *Chromatography*. McGraw-Hill, USA.
- Butler L.G., M.L. Price y J.E. Brotherton. 1982. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 1087-1089.
- Caygil J.C. y I. Mueller-Harvey. 1999. Tannins. Their nature and biological significance. Nottingham University Press. Nottingham, U.K. p. 17-37
- Chiquette J., K.L. Cheng, J.W. Costerton y L.P. Milligan. 1998. Effect tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*) using *in vitro* and *in sacco* techniques. *Can. J. Anim. Sci.*, 68: 751-760.
- Dawra R.K., H.P.S. Makkar y B. Singh. 1988. Protein binding capacity of microquantities of tannins. *Anal. Biochem.*, 170: 50-53.
- Dawson J.M., P.J. Buttery, D. Jenkins, C.D. Wood y M. Gill. 1999. Effect of dietary quebracho tannins on nutrient utilization and tissue metabolism, in sheep and rats. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1423-1430.
- Degen A., H.P.S. Makkar, K. Becker y N. Borowy. 1995. *Acacia saligna* as a fodder tree for desert livestock. *J. Sci. Food Agric.*, 68: 65-71.
- De Marcano D. y M. Hasegawa. 1991. *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela 451 p.p.
- Fernández N., E. Chacín, C. García, N. Alastre, F. Leal y C.F. Forster. 1999. The use of seed pods from *Albizia lebeck* for the removal of alkybenzene sulphonates from aqueous solution. *Process Biochem.* 31(4): 383-387.
- Fish B.C. y L.U. Thompson. 1991. Lectin-tannin interactions and their influence on pancreatic amylase activity and starch digestibility. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 727-731.

- Freeland W.J., P.H. Calcott y R.L. Anderson. 1985. Tannins and saponins: interaction in herbivore diets. *Biochem. System Ecol.*, 13: 189-193.
- Gamble G.R., D.E. Akin, H.P.S. Makkar y K. Becker. 1996. Biological degradation of tannins *Sericea lespedeza* by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispota* and *Cyathus stercoreus* analyzed by solid-state ^{13}C -NMR spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3600-3604.
- Garg S.K., H.P.S. Makkar, K.B. Nagal, S.K. Sharma, D.R. Wadhwa y B. Singh. 1992. Toxicological investigations into oak (*Quercus incana*) leaf poisoning in cattle. *Vet. Human Toxicol.*, 34: 161-164.
- Getachew G., H.P.S. Makkar y K. Becker. 1998. Tannin-binding agents to alleviate anti-microbial effects of tannins in the rumen. 3rd Tannin Conference "Plant Polyphenol: Chemistry and Biology", Bend, Oregon, USA.
- Getachew G., H.P.S. Makkar y K. Becker. 2000a. Stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production in presence and absence of polyethylene glycol for tannin containing browses, gas production; fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity, An EAAP Satellite Symposium, Wageningen, pp. 46-47.
- Getachew G., H.P.S. Makkar y K. Becker. 2000b. Tannins in tropical browses: Effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3581-3588.
- Getachew G., H.P.S. Makkar y K. Becker. 2000c. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Brit. J. Nutr.*, 84: 73-83.
- Getachew G., H.P.S. Makkar y K. Becker. 2002. Tropical browse contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production an stoichiometrical relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *J. Agric. Sci.*, 139: 341-352.
- Githiori J.B., J. Høglund, P. Waller y R.L. Baker. 2003. The anthelmintic efficacy of the plant *Albizia anthelmintica*, against the nematode parasites *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. *Vet. Parasitology*, 116: 23-34.

- Goldstein W.S. y K.C. Spencer. 1985. Inhibition of cyanogenesis by tannins. *J. Chem. Ecol.*, 11: 847-857.
- Goodchild A.V., F.J. El Hamein, H.P.S. Makkar, A.A. El Monein y P.C. Willians. 1997. Near infrared based method. 18th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, Haus der Technik, Essen, Alemania.
- Guyot S., N. Marnet y J.M. Drilleau. 2001. Thiolysis HPLC characterization of apple proanthocyanidins covering a large of polymerization states. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 14-20.
- Hagerman A.E. 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ecol.*, 13: 437- 449.
- Hagerman A.E., K.M. Riedl y R.E. Rice. 1999. Tannins as biological antioxidants. *En* Gross G.G. y T. Yoshida (Eds) *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*. Kluwer Academic & Plenum Publisher. New York, pp. 495-505.
- Hagerman A.E. y L.G. Butler. 1978. Protein precipitable method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 809-812.
- Hagerman A.E. y L.G. Butler. 1980. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *J. Agric. Food Chem.*, 28: 944-947.
- Hagerman A.E. y L.G. Butler. 1981. Specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Biol. Chem.*, 256: 4494-4497.
- Hagerman A.E., M.E. Rice y N.T. Rritchard. 1998. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicateching (4→8) catechin (procyanidin). *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2590-2595.
- Hagerman A.E., Y. Zhao y S. Johnson. 1997. Methods for determination of condensed and hydrolysable tannins. *En* Shahidi F. (Ed) *Antinutrients and Phytochemicals in Food*. ACS Symposium Series N° 662. American Chemical Society, pp. 209-222.
- Hanley T.A., C.T. Robbins, A.E. Hagerman y C. McArthur. 1992. Predicting digestible protein and digestible dry matter in tannin-containing forages consumed by ruminants. *Ecology*, 73: 537- 541.
- Hartzfeld P.W., R. Forkner, M.D. Hunter y A.E. Hagerman. 2002. Determination of hydrolysable tannins (gallotannins and

- ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1785-1790.
- Haslam E. 1965. Galloyl esters in the Aceraceae. *Phytochem.*, 4: 495-498.
- Henson G.L., L. Niemeyer, G. Ansong, R. Forkner, H.P.S. Makkar y A.E. Hagerman. 2003. Modified method for determining protein-binding capacity of plant polyphenolics using radiolabeled protein. *Phytochem. Anal.*, 46: 231-242.
- Hight R.J. y E.A. Sokoloski. 1975. Structural Investigation of Natural Products by Newer Methods of NRM Spectroscopy. *Progress in the Natural Chemistry of Organic Natural Products*. Springer-Verlag. USA.
- Hoffmann E.M., S. Muetzel y K. Becker. 2002. A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds. *Brit. J. Nutr.*, 87: 421-426.
- Inoue K.H. y A.E. Hagerman. 1988. Determination of gallotannins with rhodanine. *Anal. Biochem.*, 169: 363-369.
- Jansman A.N., A.A. Frohlich y R.R. Marquardt. 1994. Production of proline-rich proteins by the parotid glands of rats is enhanced by feeding diets containing tannins from faba beans (*Vicia faba* L.). *J. Nutr.*, 124: 249-258.
- Jones R.J., J.H.F. Meyer, M. Bechaz y M.A. Stoltz. 2000. An approach to screening potential pasture species for condensed tannin activity. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 85: 269-277.
- Kahiya C., S. Mukaratirwa y S.M. Thamsborg. 2003. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitology*, 115: 265-274.
- Kahn L.P. y A. Díaz-Hernández. 2000. Tannins with antihelmintic properties. *En Brooker J.D. (Ed) Tannins in Livestock and Human Nutrition*. ACIAR Proceedings N° 92, pp. 130-139.
- King R.A. 2000. The role of polyphenols in human *En Brooker J.D. (Ed) Tannins in Livestock and Human Nutrition*. ACIAR Proceedings N° 92, pp. 75-81.
- Labarbe B., V. Cheynier, F. Brossaud, J.M. Souquet y M. Moutounet. 1999. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to

- their degree of polymerization. *J. Agric Food Chem.*, 47: 2719-2723.
- Lamers J., A. Buerkert, H.P.S. Makkar, M.V. Oppen y K.I. Becker. 1996. Biomass production, feed economic value of fodder weeds as by-products of millet. *Exp. Agric.*, 32: 317-326.
- Larwence A., F. Hammouda y A. Salah. 1984. Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. Role des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton: effet d'une addition de polyethylene glycol 4000. *Ann. Zootech.*, 33(4): 533-543.
- Lei Z., J. Jervis y R.F. Helm. 2001. Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of wood products. *J. Agric Food Chem.*, 49:1165-1168.
- Lowry J.B. y E.A. Sumpter. 1990. Problems with ytterbium precipitation as a method for determination of plant phenolics. *J. Sci. Food Agric.*, 52: 287-288.
- Makkar H.P.S. 1989. Protein precipitation methods for quantification of tannins: A review. *J. Agric Food Chem.*, 37: 1197-1202.
- Makkar H. P. S. 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. A laboratory manual. Kluwer Academic Publishers.
- Makkar H.P.S., A.V. Goodchild, A.M. Abd-El-Monein y K. Becker. 1996. Cell-constituents, tannin levels by chemical and biological assays and nutritional value of some legume foliage and straws. *J. Sci Food Agric.*, 71: 129-136.
- Makkar H.P.S. y B. Singh. 1991. Composition tannins levels and *in sacco* dry matter digestibility of fresh and fallen oak (*Quercus incana*) leaves. *Bioresouce Technol.*, 37: 185-187.
- Makkar H.P.S. y B. Singh. 1992a. Detannification of oak leaves: Treatments and their optimization. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 36: 113-127.
- Makkar H.P.S. y B. Singh. 1992b. Effect of steaming and autoclaving oak (*Quercus incana*) leaves on levels of tannins, fibre and lignin and *in sacco* dry matter digestibility. *J. Sci. Food Agric.*, 59: 469-472.
- Makkar H.P.S. y B. Singh. 1992c. Effect of wood ash on tannin of oak (*Quercus incana*) leaves. *Bioresource Technol.*, 41: 85-86.

- Makkar H.P.S. y B. Singh. 1993. Effect of storage and urea addition on detannification and *in sacco* dry matter digestibility of mature oak (*Quercus incana*) leaves. Anim. Feed Sci. Technol., 41: 247-259.
- Makkar H.P.S., B. Singh y R.K. Kamra. 1994. Biodegradation of tannin in oak (*Quercus incana*) leaves by *Sporotrichum pulverulentum*. Letters in Applied Microbiology, 18: 42-44.
- Makkar H.P.S., B. Singh y R.K. Dawra. 1991. Tannin levels in the leaves of some oak species at different stages of maturity. J. Sci. Food Agric., 54: 513-519.
- Makkar H.P.S., B. Singh y S.S. Negi. 1989. Relationship of rumen degradability with biomass accumulation, cell wall constituents and tannin levels in some tree leaves. Anim. Prod., 49: 299-303.
- Makkar H.P.S., B. Singh y S.S. Negi. 1990. Tannin levels and their degree of polymerization and specific activity in some agro-industrial by-products. Biol. Wastes, 31: 137-144.
- Makkar H.P.S., G. Gamble y K. Becker. 1999. Limitations of the butanol-hydrochloric acid-iron assay for bound condensed tannin. Food Chem., 66: 129-133.
- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1993a. Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannin. Chem. Ecol., 19: 613-621.
- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1993b. Behavior of tannic acid from various commercial sources towards some chemical and protein precipitation assays. J. Sci. Food Agric., 62: 295-299.
- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1994a. Some problems in the determination of tannins possible solutions. Acta Hort., 381: 782-788.
- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1994b. Isolation of tannins from trees and shrubs and their properties. J. Agric Food Chem., 42: 731-734.
- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1996. A bioassay tannins. Polyphenols Comm., 96: 197-198.
- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1997a. Adaptation of cattle to tannins role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. Anim. Sci., 67: 277-281.
- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1997b. Nutritional implications of bound proanthocyanidins. XIII Int. Grassland Cong., Winnipeg, Canada

- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1998. Do tannins in leaves of trees and shrub from African and Himalayan region differ in level and activity? *Agroforestry Systems*, 40: 59-68.
- Makkar H.P.S. y K. Becker. 1999. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *Brit. J. Nutr.*, 81: 107-113.
- Makkar H.P.S., K. Becker, H.L. Abel y C. Szegletti. 1995. Degradation of condensed tannin by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentation processes in the RUSITEC. *J. Sci. Food Agric.*, 69: 495-500.
- Makkar H.P.S., R.K. Dawra y B. Singh. 1987. Protein precipitation assay for quantitation of tannins: Determination of protein in tannin-protein complex. *Anal. Biochem.*, 166: 465-439.
- Makkar H.P.S., M. Blummel y K. Becker. 1995a. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone and polyethylene glycol with tannins and their implications in gas production and the digestibility in *in vitro* techniques. *Brit. J. Nutr.*, 73: 897-913.
- Makkar H.P.S., M. Blummel y K. Becker. 1995b. *In vitro* effects and interactions of tannins and saponins and fate of tannins in rumen. *J. Sci. Food Agric.*, 69: 481-493.
- Makkar H.P.S., M. Blummel y K. Becker. 1997a. Application of and *in vitro* gas method to understand the effects of natural plant products on availability and partitioning of nutrients BSAP Occasional Meeting on "In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants" Reading, U.K.
- Makkar H.P.S., M. Blummel y K. Becker. 1997b. *In vitro* rumen apparent and true digestibilities of tannin-rich forages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 67: 245-251.
- Makkar H.P.S., M. Blummel y K. Becker. 1998. Potential limitations of and *in vitro* gas method for studying the effects of plant defensive components on rumen fermentation. 3rd International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed. Wageningen, The Netherlands.

- Makkar H.P.S., M. Blummel, N.K. Borowy y K. Becker. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.*, 61: 161-165.
- Makkar H.P.S., N. Borowy, K. Becker y A. Degen. 1995. Some problems in fiber determination in tannin rich forages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 55: 67-76.
- Makkar H. P. S., R. K. Dawra y B. Singh. 1988a. Changes in tannin content, polymerization and protein-precipitation capacity in oak (*Quercus incana*) leaves with maturity. *J. Sci. Food Agric.*, 44: 301-307.
- Makkar H.P.S., R.K. Dawra y B. Singh. 1988b. Determination of both tannin and protein in a tannin-protein complex. *J. Agric Food Chem.*, 36: 523-525.
- Makkar H.P.S., K. Becker, E. Abel y E. Pawelzik. 1997. Nutrient contents, rumen protein degradability and antinutritional factor in some colour-and white-flowering cultivars of *Vicia faba* beans. *J. Sci. Food Agric.*, 45: 511-519.
- Matthews S., I. Mila, A. Scalbert, B. Pollet, C. Lapiere, C.L.M. du Penhoat, C. Rolando y D.M.X. Donnelly. 1997. Method of estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *J. Sci. Food Chem.*, 45: 1195-1201.
- McAllister T.A., H.D. Bae, G.A. Jones y K.J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.*, 72: 3004-3018.
- McNeill D.M., M. Komolong, N. Gobiun y D. Barber. 2000. Influence of dietary condensed tannins on microbial crude protein supply in sheep. *En Brooker J.D. (Ed) Tannins in Livestock and Human Nutrition. ACIAR Proceedings N° 92*, pp. 57-61.
- McNeill D.M., N. Osborne, M. Komolong y D. Nankervis. 1998. Condensed tannins in the *Leucaena* genus and their nutritional significance for ruminants *En Shelton H.M., R.C. Gutteridge, B.F. Mullin y R.A. Bray (Eds) Leucaena. Adaptation, Quality and Farming Systems. ACIAR Proceedings N° 86*, pp. 205-214.
- McSweeney C.S., B. Palmer, D.M. McNeil y D.O. Krause. 2001. Microbial interactions with tannins nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91: 83-93.

- McSweeney C.S., P.M. Kennedy y A. John. 1998. Effects of ingestion of hydrolysable tannins in *Terminalia oblongata* on digestion in sheep fed *Stylosanthes hamata*. Aust. J. Agric. Res., 39: 235-244.
- Menke K.H., L. Roab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz y W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci., 93: 217- 222.
- Miller S.M., A.V. Klieve, J.J. Plumb, R. Aisthorpe y L.L. Blackall. 1997. An *in vitro* cultured rumen inoculum improves nitrogen digestion in mulga-fed sheep. Aust. J. Agric. Res., 48: 403-409.
- Min B.R., W.C. McNabb, T.N. Barry y P.D. Kemp. 1999. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency wool production in sheep during late summer and autumn. J. Agric. Sci., 32: 141-145.
- Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. Anim Feed. Sci. Technol., 91: 3-20.
- Mueller-Harvey I y A.B. McAllan. 1992. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. Morrison Press, London, U.K.
- Mueller-Harvey I., J.D. Reed y R.D. Hartley. 1987. Characterizations of phenolic compounds, including flavonoids and tannins of 10 Ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. J. Sci. Food. Agric. 39: 1-14.
- Naurato N., P. Wong, Y. Lu, K. Wroblewski y A. Bennick. 1999. Interaction of tannin with human salivary histatins. J. Agric. Food Chem., 47: 2229-2234.
- Nelson K.E., A.N. Pell, P. Schofield y S. Zinder. 1995. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolysable tannins. Appl. Environ. Microbiol., 61: 3293-3298.
- Nelson K.E., M.L. Thonney, T.K. Woolston, S. Zinder y A.N. Pell. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. Appl. Microbiol., 64: 3824-3830.
- Nicholson K., L.G. Butler y T.N. Asquith. 1986. Glycoproteins from *Calletrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. Phytochem., 76: 3824-2830.

- Nwannenna A.I., A. Madej, T.J.O. Lundh y G. Fredriksson. 1994. Effects of oestrogenic silage on some clinical and endocrinological parameters in ovariectomized heifers. *Acta Vet. Scand.*, 35(2): 173-183.
- Odenyo A.A., C.S. McSweeney, B. Palmer, D. Negassa y P.O. Osuji. 1999. *In vitro* screening of rumen fluid samples from indigenous African ruminants provides evidence for rumen fluid with superior capacities to digest tannin-rich fodders. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 1147-1157.
- Orskov E.R. 1982. Rumen microorganisms and their nutrition. *En* Orskov E.R (Ed) Protein Nutrition in Ruminants. pp. 19-40.
- Palmer B. y C.S. McSweeney. 2000. Tannins in *Calliandra calothyrsus*: effect of polyethylene glycol (PEG) and an evaluation of 19 accessions. *En* Brooker J.D. (Ed) Tannins in Livestock and Human Nutrition. ACIAR Proceedings N° 92, pp. 36-39.
- Pell A.N., T.K. Woolston, K.E. Nelson y P. Schofield. 2000. Tannins: Biological activity and bacterial tolerance. *En* Brooker J.D. (Ed) Tannins in Livestock and Human Nutrition. ACIAR Proceedings N° 92, pp. 111-116.
- Pellissier F. 1994. Effect of phenolic compounds in humus on the natural regeneration of spruce. *Phytochem.*, 36: 865-867.
- Peng S., A. Scalbert y B. Monties. 1991. Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochem.*, 30: 775-778.
- Perchellet E.M., H.U. Moutaseb, H.P.S. Makkar y P. Perchellet. 1996. Ability of tannins extracted from various tree leaves inhibit the biomarkers of tumor promotion in mouse skin *in vivo*. *Int. Oncology*, 9: 801-809.
- Pérez-Maldonado R.A. y B.W. Norton. 1996. The Effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *Brit. J. Nutr.*, 76: 515-553.
- Pérez-Maldonado R.A., B.W. Norton y G.L. Kerven. 1995. Factors affecting *in vitro* formation of tannin-protein complexes. *J. Sci. Food Agric.*, 69: 291-298.
- Pritchard D.A., P.R. Martín y P.K. O'Rourke. 1992. The role of condensed tannins in the nutritional value of mulga (*Acacia aneura*) for sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 43: 1739-1746.

- Polya G.M. y L.I. Foo. 1994. Inhibition of eukaryote signal-regulated protein kinases by plant -derivated catechin-related compounds. *Phytochem.*, 35(6): 1399-1405.
- Porter L.J., L.N. Hrstich y B.G. Chan. 1986. The conversion of procyanidin and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem.*, 25: 223-230.
- Price K.R., L.T. Johnson y G.K. Fenwick. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. *Rev. Food Sci. Nutr.*, 26: 27-135.
- Price M.L., S. Van Scoyoc y L.G. Butler. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 1214-1218.
- Reed J.D., P.J. Horvath, M.S. Allen y P.J. Van Soest. 1985. Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium. *J. Sci. Food Agric.*, 36: 255-261.
- Ruohomaki K., F.S. Chaping, E. Haukioja, S. Neuvonen y J. Suomela. 1996. Phenolic compounds, ecology and function. *Ecology*, 77: 2302-2311.
- Salawu M.B., T. Acamovic, C.S. Stewart y B. Maasdorp. 1997. Assesment of the nutritive value of *Calliandra calothyrsus* its chemical composition and the influence of tannins, pipercolic acid and polyethyleneglycol on *in vitro* organic matter digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 69: 219-232.
- Schofield P., D.M. Mbugua y A.N. Pell. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91:21-40.
- Silanikove N., A. Perevolotsky y F.D. Provenza. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91: 69-81.
- Silanikove N., N. Gilboa, I. Nir, A. Perevolotsky y Z. Nitsan. 1996. Effect of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus*, *Ceratonia siliqua*) by goats. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 199-205.
- Silanikove N., Z. Nitsan y A. Perevolotsky. 1996. Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of

- tannin-containing leaves (*Ceratonia siliqua*). J. Agric. Food Chem., 42: 2844-2847.
- Stienezen M., G.C. Waghorn y G.B. Douglas. 1996. Digestibility and effects of condensed tannins on digestion of sulla (*Hedysarum coronarium*) when fed to sheep. N. Z. J. Agric. Res., 39: 215-221.
- Suck J.P., G.L. Sang, C. Sang, Y.L. Boum y J.A. Young. 1997. Larvicidal and antifeeding activities of oriental medicinal plant extracts against four species of forest insect pest. Appl. Entomol. Zool., 32(4): 601-608.
- Sun Y.K., G.J. Jian y K.K. Hee. 2000. Two flavonoids from the leave of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukaemia (HL-60) cell line. Biol. Pharm. Bull., 23(4): 451-455.
- Terrill T.H., A.M. Rowan, G.B. Douglas y T.N. Barry. 1992. Determination of bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. J. Sci. Food Agric., 58: 321-329.
- Terrill T.H., G.C. Waghorn, D.J. Woolley, W.C. McNabb y N.T. Barry. 1994. Assay and digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. Brit. J. Nutr., 72: 467-477.
- Tilley J.M. y R.A. Terry. 1963. A two technique for the *in vitro* digestion for forage crops. J. Brit. Grasslands. Soc., 18: 104-111.
- Waghorn G. C. y I. D. Shelton. 1997. Effects of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. J. Agric. Sci., 128: 365-372.
- Waghorn G.C., I.D. Shelton y W.C. McNabb. 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. I. * Non- nitrogenous aspects. J. Agric. Sci., 123: 99-107.
- Wang Y., G.B. Douglas, G.C. Waghorn, T.N. Barry, A.G. Foote y R.W. Purchas. 1996. Effects of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *Lotus corniculatus* and lucerne (*Medicago sativa*). J. Agric. Sci., 126: 87-93.
- Willimas D.H. y I. Fleming. 1966. Spectroscopy Methods in Organic Chemistry. McGraw-Hill, USA. 2nd Ed.
- Willis R.B. y P.R. Allen. 1998. Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. The Analyst, 123: 435-439.

- Yang C.M.J. y J.B. Russell. 1994. Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation *in vitro*. Appl. Environ. Microbiol., 58: 3954-3958.
- Zinn R. A. y F.N. Owens. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. Can. J. Anim. Sci., 66: 157-166.