

VARIABILIDAD DEL METODO FOLIN-DENIS EN LA DETERMINACION DE EQUIVALENTES DE ACIDO TANICO EN MUESTRAS DE SORGO

N. B. REINAUDI, O. J. RUBIOLO Y J. VAQUERO. *

Resumen

El propósito del presente trabajo es evaluar la influencia de algunos factores que condicionan la variabilidad del método de Folin-Denis para determinar equivalentes de ácido tánico en grano de sorgo. Se estudió la influencia de la centrifugación previa a la medición espectrofotométrica y el tiempo de reflujo más conveniente para la extracción de sustancias tánicas. La aplicación de centrifugación al extracto acuoso, previo reposo de toda la noche, mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) con respecto al testigo sin centrifugar. Entre ambos procedimientos se obtuvo $r = 0,997$ y la ecuación de regresión responde a $y = 0,0627 + 1,033 x$. Los coeficientes de variación oscilaron entre 1,94 y 5,77 % para muestras sin centrifugar y 0,71 a 3,85 % con centrifugación. Por lo tanto para disminuir la variabilidad del método conviene aplicar una centrifugación de 10 minutos a 5000 r.p.m. al extracto acuoso. Para el tiempo de reflujo se determinó que existen diferencias de extracción entre 2 y 5 horas aunque tiende a aumentar a medida que se incrementa el tiempo. Para determinaciones de rutina es suficiente una extracción de tres horas de reflujo aunque para mayor precisión se recomiendan 5 horas.

Abstract

The purpose of this work is to evaluate the influence of some factor that condition the variability of the Folin-Denis method to determine de equivalents of tannic acid in grain of sorghum. We studied the influence of the centrifugation previous to the spectrophotometric measurement. It was also studied the most convenient refluxe time for the extraction of tannic substances. The aplication of centrifugation to the aqueous extract after a night rest showed highly significant differences ($p < 0,01$) with respect to the sample without centrifugation. Considering both procedures, we got $r = 0,997$ and the

* *Fac. Agronomía; UNLPam - Santa Rosa - 6300 - La Pampa - Cát. Química Analítica y Cerealicultura.*

equation of regression responds to $y = 0,0627 + 1,033 x$. The coefficient of variations fluctuate between 1,94 and 5,77 % for samples without centrifugation and between 0,71 and 3,85 % for samples with centrifugation. Therefore, in order to decrease the variability of the methods it is convenient to apply a ten minute centrifugation at 5.000 r.p.m. to the aqueous extract. It was determined that for the reflux time there are no differences of extraction between 2 and 5 hours, though it tends to increase as time increases. For routine determinations a 3 hours reflux extraction is enough but 5 hours are advisable for greater precision.

INTRODUCCION

El contenido de sustancias tánicas, comunmente llamadas taninos es una de las características determinantes de la calidad nutritiva e industrial del grano de sorgo.

Como contribución a estas materias se ha desarrollado el presente trabajo, dedicado a investigar la precisión y alcance de la aplicación de una centrifugación previa a la medición espectrofotométrica; con lo cual disminuyen las partículas en suspensión. También se estudia el tiempo de reflujo más adecuado para una extracción más conveniente.

Organismos oficiales como la Junta Nacional de Granos (J.N.G., 1979) y estaciones experimentales (Mardiello, 1980) efectúan esta determinación mediante el método de Folin-Denis (AOAC, 1960).

Dos factores que condicionan la variabilidad del método son, por un lado el arrastre de partículas sobrenadantes cuando se toma la alícuota para la determinación espectrofotométrica de las sustancias tánicas en ella contenidas; estas partículas en suspensión y coloides son provenientes de la digestión del propio grano de sorgo y absorben y reflejan parte de las radiaciones del haz incidente. Por otro lado la extracción de sustancias tánicas puede variar con el tiempo que se empleó.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron por duplicado muestras de los siguientes híbridos comerciales de sorgo granífero: Dorado A, Pioneer 8440, Pioneer 866, Litoral 2, Norteño A, DA 60R y DA 54+ en los siguientes estados de madurez: 14, 21, 28, 35 y 42 días de iniciada la antesis para estudiar la incidencia de una centrifugación previa a la determinación de equivalentes de ácido tánico. Estas muestras corresponden a la campaña 79/80, provenientes de parcelas cultivadas en el Campo de Enseñanza de la Facultad de agronomía de la UNLPam. Muestras de 0,5000 g de sorgo granífero molido (de tal manera que pase por una malla de 60 mesh); fueron sometidas a reflujo, en medio acuoso durante tres horas; este extracto acuoso se llevó a 250 cm³ en un matraz aforado. Se dejó en

reposo toda la noche y al día siguiente se agitó para medir la alícuota. Para estudiar el efecto de las partículas en suspensión se procedió como se describe en los apartados a y b. En ambos procedimientos se siguió el método de Folin-Denis (AOAC, 1960) comparándose las absorvancias de las muestras con una curva linal cuyo rango de concentraciones fue de 1 a 5 ppm. de ácido tánico.

- a) Una parte de la solución se sometió a una centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos y del sobrenadante se midió una alícuota para la determinación espectrofotométrica de los equivalentes de ácido tánico.
- b) Otra parte se dejó reposar 5 minutos y después se midió la alícuota para la correspondiente determinación de los equivalentes de ácido tánico.

En ambos casos se usó una longitud de onda de 725 nm, siendo el aparato un Coleman Junior II A. Estos datos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de "t" para datos apareados (Snedecor y Cochran, 1975).

Otras cuatro muestras correspondientes a los híbridos Relámpago 50, Cimarrón, Pioneer 8440 y Litoral 2 correspondientes a la campaña 80/81, también sembradas en el Campo de Enseñanza de la Facultad de Agronomía de la UNLPam. fueron analizadas por cuadruplicado a los efectos de determinar el coeficiente de variación entre los procedimientos a y b.

A los efectos de determinar el tiempo de reflujo más adecuado se trabajó con muestras de Dorado A, Pioneer 8440 y BR+ correspondientes a la campaña 80/81. Muestras de 0,5000 g adecuadamente molidas se sometieron a los siguientes tiempos de reflujo: 2, 3, 4 y 5 horas contadas a partir de ebullición. Los equivalentes de ácido tánico fueron determinados siguiendo la técnica de Folin-Denis previa centrifugación de la alícuota del extracto reflujo. Para el análisis de la varianza de estos resultados se usó la transformación a raíz cuadrada (Steel and Torrie, 1960).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro 1 se expresan los equivalentes de ácido tánico obtenido con los distintos híbridos comerciales estudiados y en los diferentes estados de madurez, mediante los dos procedimientos, arroja diferencias entre ambos tratamientos altamente significativos.

También se analizó la correlación entre ambas técnicas dando un $r = 0,998$. La ecuación de regresión para estas muestras responde a una recta $y = 0,0627 + 1,033 x$. Como término independiente se consideró el tenor de equivalentes de ácido tánico obtenido sin previa centrifugación. La Figura 1 representa la recta de regresión ajustada de los equivalentes de ácido tánico sin centrifugado respecto a los

Cuadro 1 - Eq. de Ac. tánico en 7 híbridos de sorgo a distintos días de iniciada la antesis sin y con centrifugación previa a la determinación espectrofotométrica.

Variedad	Días a partir de la antesis	Eq.Ac.Tánico %M.S.		Eq.Ac.Tánico %M.S.	
		sin	cent.	con	cent.
Dorado A	14	1,17		0,97	
	21	0,72		0,70	
	28	0,51		0,44	
	35	0,41		0,37	
	42	0,36		0,32	
Pioneer 866	14	0,82		0,72	
	21	0,38		0,36	
	28	0,39		0,32	
	35	0,31		0,26	
	42	0,31		0,26	
Pioneer 8440	14	1,07		0,95	
	21	0,41		0,37	
	28	0,40		0,34	
	35	0,36		0,30	
	42	0,28		0,26	
Litoral 2	14	2,49		2,39	
	21	2,50		2,25	
	28	2,06		1,92	
	35	1,30		1,20	
	42	1,42		1,30	
Norteño A	14	1,07		0,81	
	21	0,60		0,81	
	28	0,35		0,26	
	35	0,32		0,24	
	42	0,30		0,25	
2 DA 60 R	14	3,98		3,83	
	21	2,10		1,92	
	28	1,91		1,86	
	35	1,90		1,85	
	42	1,86		1,80	
DA 54+	14	1,09		0,96	
	21	0,79		0,58	
	28	0,64		0,52	
	35	0,55		0,50	
	42	0,52		0,50	
	-	35,65		32,38	
		1,02		0,93	

equivalentes de ácido tánico con centrifugación. La observación de los coeficientes de variación (Cuadro 2) indica en todos los casos una menor variación en las muestras centrifugadas respecto a las no centrifugadas.

Cuadro N^o 2. Contenido de eq. de ác. tánico en 4 muestras con 4 repeticiones y sus respectivos coeficientes de variación.

Repetición	Relámpago 50		Cimarrón		Pioneer 8440		Litoral 2	
	sin c.	con c.	sin c.	con c.	sin c.	con c.	sin c.	con c.
Primera	1,25	1,13	0,34	0,26	0,29	0,26	2,62	2,43
Segunda	1,23	1,15	0,32	0,26	0,30	0,25	2,58	2,46
Tercera	1,33	1,20	0,31	0,26	0,32	0,25	2,58	2,43
Cuarta	1,38	1,17	0,31	0,27	0,28	0,27	2,50	2,46
Σ	5,19	4,65	1,28	1,04	1,19	1,03	10,28	9,78
X	1,30	1,16	0,32	0,26	0,30	0,26	2,57	2,45
C.V.	5,38	2,59	4,42	3,85	5,77	3,85	1,94	0,71

El cuadro 3 representa los resultados de las tres muestras sometidas a 2, 3, 4 y 5 horas de digestión; no se observan diferencias significativas entre los tiempos de digestión al efectuarse el análisis de la varianza, previa transformación a raíz cuadrada. Tampoco se halla interacción entre las variedades y el tiempo de reflujo.

Cuadro N^o 3 - Contenido de equivalentes de ácido tánico en función del tiempo de reflujo, expresado en %.

Muestra Tiempo	2 h	3 h	4 h	5 h
Pioneer 8440	0,23	0,25	0,25	0,29
Dorado A	1,43	1,50	1,48	1,55
B R 64 R+	3,25	3,65	3,70	3,70

Si en la muestra Dorado A consideramos el 100 % de sustancias tánicas extraídas a las 5 horas de reflujo serán de 91,05 % ; 95,85 % y 93,61 % respectivamente para 4, 3 y 2 horas de extracción . Para las muestras Pioneer 8440 y BR 64 R+ estos porcentajes serán 84,35, 87,80 , 86,96 % y 86,90 , 98,08 y 90,87 % respectivamente. Burns, 1963

trabajando con *Sreicea Lespedeza* llegó a la conclusión que se extrae un 95 % o más en las primeras dos horas. Por esta razón este investigador usó en sus trabajos 3 horas de extracción cuando no se requería precisión alta. Para la obtención de datos más exactos se recomienda un tiempo de extracción de 5 horas como mínimo. Los resultados de nuestro trabajo concuerdan con los obtenidos por Burns y por lo tanto para análisis de rutina resulta suficiente una extracción de 3 horas.

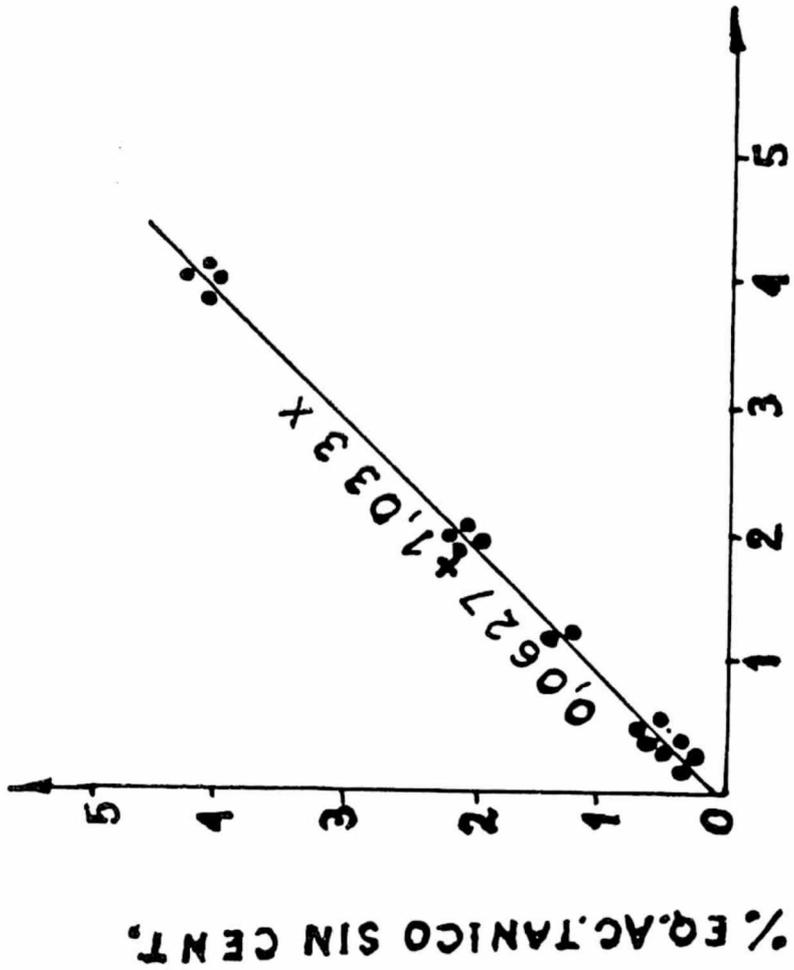
CONCLUSIONES

Dada la alta significancia entre los resultados de las muestras centrifugadas y aquellas no sometidas a una centrifugación, previa a la determinación espectrofotométrica del tenor de equivalentes de ácido tánico, se recomienda que en las futuras determinaciones se efectúe una centrifugación de 10 minutos a 5.000 r.p.m. Los análisis efectuados con muestras sometidas a centrifugación presentan menores coeficientes de variación: 2,59; 3,85; 3,85 y 0,71 respecto a las no centrifugadas cuyos valores de los C.V. son respectivamente de 5,38; 4,42; 5,77 y 1,94.

En cuanto al tiempo de extracción se recomienda un mínimo de 3 horas para trabajos de rutina y 5 horas para obtener mayor exactitud.

BIBLIOGRAFIA

- ANON., Official methods of analysis. AOAC, 1960. 9 th. Ed. 111.
- BURNS, R.E., 1963. Method of tannin analysis for forage crop evaluation. Bull. Tech. N.S. 32. Georgia Agricultural Experiment Station. University of Georgia College of Agriculture. 14 p.
- JUNTA NACIONAL DE GRANOS. 1979. Evaluación de la calidad del sorgo en la República Argentina: Proteínas y taninos. 6p.
- MARDIELLO, R.A. y otros. 1980. Efecto del nivel de tanino del sorgo sobre su utilización para cerdos en crecimiento y terminación. INTA. Pergamino. VII Reunión Científica - técnica AAPA.
- SNEDECOR, G. y W. COCHRAN, 1975. Métodos estadísticos. Trad. por J.A. Reinosa Fuller. 1era. ed. en español de la 6ta. en inglés. México. Continental. 703 p.
- STEEL, R.G. and J.H. TORRIE, 1960. Principles and procedures of Statistics with special references to the biological sciences. New York Mc. Graw Hill. 481 p.



% EQ. AC. TANICO CON CENT.

Fig. N°1 Recta de regresión