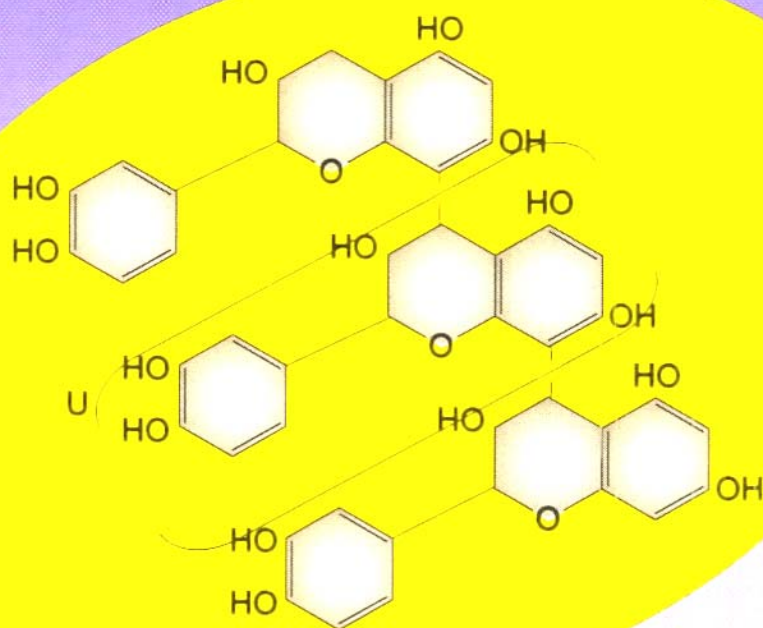


TANINO NO GRÃO DE SORGO

BASES FISIOLÓGICAS E MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Arlindo Porto Neto

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: José Roberto Rodrigues Peres

Dante Daniel Giacomelli Scolari

Elza Ângela Battaglia Brito da Cunha

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MILHO E SORGO

Chefe: Antônio Fernandino de Castro Bahia Filho

Chefe Adjunto de Pesquisa: Maurício Antônio Lopes

Chefe Adjunto Administrativo: José Hamilton Ramalho

Chefe Adjunto de Desenvolvimento: Morethson Resende

CIRCULAR TÉCNICA Nº 27

ISSN 0100 - 8013
Dezembro, 1997

TANINO NO GRÃO DE SORGO

BASES FISIOLÓGICAS E MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO

Paulo César Magalhães
Walter Alvarenga Rodrigues
Frederico O. M. Durães

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Copyright © EMBRAPA - 1997
Embrapa Milho e Sorgo
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Telefone: (031) 779-1000
Fax (031) 779-1088
<http://www.cnpms.embrapa.br>
e-mail: cnpms@cnpms.embrapa.br

Tiragem: 2.000 exemplares

Editor: Comitê de Publicações da Embrapa Milho e Sorgo
Maurício Antônio Lopes (Presidente), Frederico Ozanan Machado
Durães (Secretário), Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da
Silva, Edilson Paiva, Paulo César Magalhães, Jamilton Pereira dos
Santos

Revisão: Dilermando Lúcio de Oliveira

Diagramação: Tânia Mara Assunção Barbosa e
Dilermando Lúcio de Oliveira

Normalização bibliográfica: Maria Tereza R. Ferreira

Capa: Leandro Franco de Souza

M 1887 1997	MAGALHÃES, P. C.; RODRIGUES, W. A.; DURÃES, F. O. M. Tanino no grão de sorgo bases fisiológicas e métodos de determinação. Sete Lagoas: EMBRAPA - CNPMS, 1997. 26p. (EMBRAPA - CNPMS. Circular Técnica, 27)
----------------	---

1. Sorgo - Grão - Tanino. I. Título II. Série

CDD. 633.174

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
TIPOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO GRÃO	6
FORMAÇÃO DO COMPLEXO TANINO - PROTEÍNA.....	7
VANTAGENS DA PRESENÇA DO TANINO.....	8
DESVANTAGENS DO TANINO NO GRÃO.....	9
REMOÇÃO DO TANINO ATRAVÉS DE MÉTODOS DE DESINTOXICAÇÃO	10
MÉTODOS PARA QUANTIFICAR O TANINO	10
DESCRIÇÃO DOS PROTOCOLOS	13
EXTRAÇÃO DO TANINO.....	13
MÉTODO FOLIN-DENIS - MARCHA DE DETERMINAÇÃO	13
CURVA-PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TANINO PELO MÉTODO FOLIN-DENIS	13
MÉTODO AZUL DA PRÚSSIA- MARCHA DE DETERMINAÇÃO	14
CURVA-PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TANINO PELO MÉTODO AZUL DA PRÚSSIA.....	14
MÉTODO BUTANOL - HCl - MARCHA DE DETERMINAÇÃO	15
CURVA-PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TANINO PELO MÉTODO BUTANOL - HCl.....	15
MÉTODO VANILINA - HCl - MARCHA DE DETERMINAÇÃO	16
CURVA-PADRÃO DO MÉTODO VANILINA - HCl	16
RESULTADOS EXPERIMENTAIS COMPARANDO MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE TANINO COM O DESEMPENHO DE AVES	17
MÉTODO PRÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DA EXISTÊNCIA DA TESTA.....	21
COMENTÁRIOS FINAIS.....	22
AGRADECIMENTOS	22
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	23

TANINO NO GRÃO DE SORGO

BASES FISIOLÓGICAS E MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO

Paulo César Magalhães¹
Walter Alvarenga Rodrigues²
Frederico O.M. Durães³

INTRODUÇÃO

O sorgo é uma planta que pertence à família Gramineae/Poaceae e o seu nome científico é *Sorghun bicolor* L. Moench. Atualmente, ocupa, entre os cereais, o quinto lugar em área plantada no mundo, atrás do trigo, arroz, milho e cevada. A produção de sorgo na América do Norte, América do Sul, Europa e Austrália se destina principalmente à alimentação animal, ao passo que na Ásia, África, Rússia, China e América Central, o grão é importante como alimento humano básico.

Devido ao fato de não apresentar uma proteção para as sementes, como, por exemplo, a palha do milho ou as glumas do trigo e da cevada, a planta de sorgo produz vários compostos fenólicos, os quais servem como uma defesa química contra pássaros, patógenos e outros competidores.

Toda planta de sorgo possui aproximadamente os mesmos níveis de proteína, amido, lipídios etc., porém vários

¹ Eng.Agr., Ph. D., Embrapa Milho e Sorgo. Cx. Postal 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG

² Eng.Agr., D. Sc., Prof. Adjunto da Universidade Federal de Goiás-Deptº de Biologia - Goiânia-GO

³ Eng. Agr., D. Sc., Embrapa Milho e Sorgo. Cx. Postal 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG

compostos fenólicos podem ocorrer ou não; entre esses compostos, destaca-se o tanino condensado, que tem ação antinutricional, principalmente para os animais monogástricos. Como esses polifenóis são metabólitos secundários, ou seja, não participam de vias metabólicas responsáveis por crescimento e reprodução, a presença e a natureza deles variam enormemente.

A presença do tanino no grão de sorgo depende da constituição genética do material. Os genótipos que possuem os genes dominantes B₁ e B₂ são considerados sorgo com presença de tanino. No passado, era comum encontrar a classificação de sorgo nos grupos I, II e III, representando, respectivamente, teores baixos, médios e altos de tanino. Hoje, sabe-se que o tanino está presente ou ausente no grão. A pesquisa tem mostrado que percentuais abaixo de 0,70% no grão, verificados em algumas análises laboratoriais, são devido a outros fenóis e não ao tanino condensado e, portanto, não são prejudiciais à dieta alimentar dos animais.

O tanino no sorgo tem causado bastante controvérsia, uma vez que, apesar de algumas vantagens agrônômicas, como a resistência a pássaros e doenças do grão, ele causa problemas na digestão dos animais, pelo fato de formarem complexos com proteínas e, assim, diminuírem a sua palatabilidade e digestibilidade.

A determinação da presença dos taninos no grão de sorgo apresenta vários problemas, uma vez que os métodos colorimétricos geralmente não diferenciam taninos de outros compostos fenólicos. Outra dificuldade é a obtenção de substâncias adequadas para serem utilizadas como padrão para esses métodos.

TIPOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO GRÃO

Os vários compostos fenólicos presentes no grão de sorgo podem afetar a cor, a aparência e a qualidade nutricional. Esses compostos podem ser classificados em três

grupos básicos: ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Os ácidos fenólicos são encontrados em todo tipo de sorgo, porém os flavonóides não são detectados em todos eles. O fenol conhecido como tanino encontra-se concentrado na testa da semente. A testa é um tecido altamente pigmentado, localizado logo abaixo do pericarpo, e sua existência é fator determinante da presença de tanino em sorgo. Existem duas classes de taninos: hidrolizáveis e condensados. Não há evidências da presença de grandes quantidades de tanino hidrolizável no sorgo. Já o tanino condensado é aquele encontrado em sorgo resistente a pássaros.

Os ácidos fenólicos não têm efeito adverso na qualidade nutricional, porém podem causar cor indesejável aos alimentos, quando processados sob condições alcalinas. Os flavanóides, a exemplo dos ácidos fenólicos, também não causam problemas na digestibilidade e palatabilidade do sorgo. Constituem um amplo grupo de compostos fenólicos encontrados nas plantas, sendo que alguns deles estão entre os principais pigmentos presentes em vegetais.

FORMAÇÃO DO COMPLEXO TANINO - PROTEÍNA

O principal problema que o tanino causa, quando presente no sorgo, é a complexação com proteínas, o que vai afetar a digestibilidade e modificar a palatabilidade (sabor adstringente).

Com base em muitos estudos, acredita-se que a associação do tanino com a proteína e a estabilidade desse complexo se deve sobretudo à formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre essas moléculas. As proteínas diferem enormemente quanto à sua afinidade pelos taninos. As principais características das proteínas que influenciam positivamente nessa associação são: alto peso molecular, estrutura mais aberta e flexível, ponto isoelétrico e conteúdo de prolina. Essa última característica é provavelmente o mais importante fator que interfere na

associação entre taninos e proteínas do sorgo, uma vez que a prolina possui características hidrofóbicas e contribui para a conformação mais aberta da molécula de proteína. Com relação à estrutura e propriedade dos polifenóis importantes na formação do complexo tanino-proteína, destacam-se três características: maior tamanho do polifenol, conformação flexível, cuja retração facilita a ligação polifenol/proteína e a baixa solubilidade do polifenol.

VANTAGENS DA PRESENÇA DO TANINO

Sob o ponto de vista agrônomo, as principais vantagens do tanino são: resistência a pássaros, resistência aos fungos causadores da podridão no grão antes da colheita, redução na germinação de grãos na panícula e resistência a insetos.

Entre as vantagens do tanino, a resistência a pássaros é talvez a mais importante, pois, em algumas regiões produtoras de sorgo, o dano causado por pássaros é tão severo que a perda da cultura pode ser total. A maior incidência do ataque de pássaros se verifica no estágio de grão leitoso a pastoso. A resistência verificada nessa fase se deve à adstringência causada pelo tanino ao formarem complexos e precipitarem as proteínas. Ressalta-se, no entanto, que, dependendo da densidade populacional dos pássaros e da não disponibilidade de outros alimentos mais palatáveis na área, eles podem até consumir sorgo com tanino.

A resistência verificada aos fungos causadores de podridão no grão antes da colheita é outra significativa vantagem do tanino, uma vez que esses fungos podem comprometer a produção e a qualidade de grãos e sementes, possivelmente reduzindo também a concentração de aflotoxina na massa de grãos. As condições ideais para o desenvolvimento dos fungos são a ocorrência de temperaturas

elevadas e altas umidades por ocasião da maturação do sorgo.

O tanino reduz também a germinação de grãos na panícula, que comumente ocorre durante períodos prolongados de chuva, após a maturação fisiológica, quando as altas temperaturas e umidade favorecem a germinação. O provável modo de ação do tanino nesse caso está relacionado com o mecanismo de dormência da semente, uma vez que, encontrando-se na testa da semente, o tanino pode retardar a absorção de água, atrasando, conseqüentemente, a germinação. Além disso, o tanino pode formar complexos e inativar enzimas envolvidas no processo de germinação.

A resistência a insetos está relacionada principalmente com os afídeos, no período inicial de crescimento do sorgo. Os compostos fenólicos não controlam, no entanto, insetos de grãos armazenados.

DESVANTAGENS DO TANINO NO GRÃO

A principal desvantagem do tanino nos grãos de sorgo é o seu efeito antinutricional, causado pelo complexo tanino-proteína, o qual provoca uma diminuição da digestibilidade, limitando, assim, o uso do sorgo na dieta animal, principalmente dos monogástricos. O efeito do tanino na digestibilidade "in vitro" da matéria seca tem sido provado em vários estudos, nos quais foi detectada correlação negativa entre a presença de tanino no grão e a digestibilidade.

O efeito antinutricional do tanino pode ser melhor avaliado quando se compara o desempenho de aves alimentadas com ração de sorgo com e sem esse composto fenólico. A resposta dos animais à dieta com tanino é verificada pela hipertrofia da glândula parótida, com produção de proteínas ricas em prolina. O tanino, além de conferir cor indesejável à ração, diminui a palatabilidade e reduz o ganho de peso dos animais monogástricos.

REMOÇÃO DO TANINO NOS GRÃOS ATRAVÉS DE MÉTODOS DE DESINTOXICAÇÃO

O tanino, quando desejável, pode ser removido do grão para superar a sua principal desvantagem, que é a característica antinutricional. Essa remoção pode ser tanto química quanto física. Dentre os métodos químicos de remoção, destacam-se o uso de água, HCl, de hidróxido de amônio, de hidróxido de potássio e de hidróxido de sódio. Todos esses reagentes removem com sucesso o tanino. Já a remoção mecânica envolve processos abrasivos, que podem, muitas vezes, reduzir o conteúdo de proteína. Há, inclusive, uma redução progressiva dos aminoácidos lisina, histidina e arginina.

MÉTODOS PARA QUANTIFICAR O TANINO

Os métodos colorimétricos são os protocolos mais comuns, sensíveis e baratos utilizados para se determinar a presença de tanino em sorgo. Todo método tem a sua limitação e a escolha específica de uma metodologia muitas vezes é baseada nas facilidades estruturais disponíveis e no número de amostras a serem avaliadas. A intenção aqui é descrever resumidamente o princípio de cada método, apontar as vantagens e desvantagens de cada um, assim como os resultados mais recentes obtidos em pesquisa conduzida para correlacionar o desempenho de aves, com diferentes metodologias de detecção de tanino.

Os métodos colorimétricos podem ser divididos em dois grupos básicos: aqueles em que as reações ocorrem com grupos fenólicos gerais, envolvendo as reações de oxir-redução ou formação de complexos com íons metálicos, (ex: Folin Denis e Azul da Prússia) e aqueles em que as reações ocorrem com um grupo funcional específico, devido a uma estrutura em particular dos taninos (ex: Butanol-HCl e Vanilina-HCl). Na interpretação dos resultados, é aconselhável

que se tenha um conhecimento básico da especificidade de cada método.

Os métodos Folin-Ciocalteu, Folin-Denis e Azul da Prússia quantificam fenóis totais e se baseiam nas reações de oxirredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos. Esses protocolos não discriminam tanino e outros compostos fenólicos. Ressalta-se, no entanto, que o sorgo não tem mostrado, na sua constituição química, grandes quantidades de outros compostos fenólicos além do tanino.

O método Folin - Ciocalteu é bastante antigo e está fora de uso. Foi substituído pelo Folin-Denis, que se baseia na redução em meio alcalino do fosfomolibdato - fosfotungstato pelos fenóis, a molibdênio de coloração azul. O padrão utilizado pelo método Folin-Denis é o ácido tânico, fonte comercial de um tanino hidrolizável. Esse foi um protocolo bastante utilizado no passado, porém hoje já é considerado superado e laborioso, além de superestimar a porcentagem de tanino.

O método Azul da Prússia é recomendado para análise geral de fenóis, porque é menos suscetível à interferência de proteína que o método Folin-Denis. A base química dessa metodologia é a redução pelos grupos hidroxifenólicos de íons Fe^{+3} a Fe^{+2} , os quais são complexados com ferrocianeto, para produzir pigmentos de coloração azul. Os métodos em que ocorre a formação de complexos entre íons metálicos e grupos fenólicos (Azul da Prússia) são mais específicos que os métodos de oxirredução (Folin-Denis).

O padrão utilizado para o Azul da Prússia é o ácido tânico. Essa metodologia é a comumente utilizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Milho e Sorgo. Apresenta uma série de vantagens em relação aos demais métodos, como, por exemplo: rapidez, simplicidade, sensibilidade e preço baixo. Além disso, apresenta uma vantagem ainda mais expressiva, que é a sua correlação com o desempenho de aves (Tabela 1). A desvantagem desse protocolo é que ele detecta fenóis totais; contudo, esse fato tornou-se irrelevante após alguns trabalhos de pesquisa,

comparando métodos para quantificar taninos em sorgo, demonstrarem maior correlação dos fenóis totais determinados por essa metodologia com o ganho de peso das aves e a digestibilidade “in vitro” da matéria seca.

Os métodos Butanol - HCl e Vanilina - HCl detectam grupos funcionais específicos dos taninos, os quais exploram as diferenças estruturais que ocorrem na molécula dos taninos. O Butanol-HCl é específico para proantocianidina (tanino condensado). Esse método é considerado o melhor para determinação do tanino condensado. Através dessa metodologia, subunidades do polímero tanino condensado são oxidadas para produzir antocianidina. Essa reação não envolve hidrólise.

Utiliza-se como padrão o tanino purificado, que pode ser obtido da planta “quebracho”, originária da América Central, ou também do “barbatimão”. A principal vantagem dessa metodologia é que ela determina os teores de tanino condensado, enquanto que as desvantagens são: método laborioso, custo e a dificuldade em se obter o padrão, uma vez que tanino purificado não é comercializável, ou seja, o laboratório terá que purificar seu próprio tanino para utilizá-lo como padrão. Convém salientar que a purificação do tanino é um processo muito difícil, uma vez que os extratos, além de conterem tanino, possuem proteínas complexadas com tanino e compostos fenólicos que não são tanino.

O método Vanilina-HCl fundamenta-se na reação da leucoantocianidina (catequina) e proantocianidina (tanino) com vanilina, em presença de HCl, para formar um composto de cor vermelho-brilhante. É um método específico para tanino condensado e alguns flavonóides. Utiliza-se, para esse método, a catequina como padrão. Dentre as vantagens dessa metodologia, está a detecção de tanino condensado. As desvantagens são: superestima o conteúdo de tanino, é laborioso e possui custo alto.

Uma das limitações dos métodos colorimétricos é a obtenção de substância adequada para ser utilizada como

padrão. Os padrões normalmente utilizados não fornecem o mesmo espectro de absorção do tanino purificado.

DESCRIÇÃO DOS PROTOCOLOS

EXTRAÇÃO DO TANINO

- 1) Moer aproximadamente 10 g de sorgo, o mais fino possível (peneira de 40 mesh);
- 2) Pesar 0,5 g de amostra e transferir para um tubo de ensaio de 15 ml;
- 3) Adicionar 10 ml de HCl 1% em metanol e tampar;
- 4) Agitar em vortex por 20 minutos;
- 5) Centrifugar a 1000 rpm, durante oito minutos, aumentando a velocidade gradativamente (200, 400, 600, 800, 1000 rpm).

Após a extração, iniciam-se as determinações, através de um dos métodos descritos a seguir. Não é aconselhável usar extrato com mais de 24 horas.

MÉTODO FOLIN-DENIS - MARCHA DE DETERMINAÇÃO

1. Adicionar em um tubo de ensaio 0,1 ml do extrato, 8,4 ml de água destilada, 1,0 ml de solução saturada de carbonato de sódio e 0,5 ml do reagente de Folin-Denis (Association. 1960). Agitar os tubos por 30 minutos e determinar a absorbância em espectrofotômetro a 760 nm.

CURVA-PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TANINO PELO MÉTODO FOLIN-DENIS

1. Pesar 100 mg de ácido tânico;
2. Adicionar, em um balão volumétrico de 1000 ml, 100 mg de ácido tânico, completando-se o volume com água destilada;
3. Pipetar alíquotas de 0 a 1,0 ml, com diferenças de 0,1 ml, em tubos de ensaio contendo 7,5 ml de água destilada;

4. Adicionar em cada tubo 0,5 ml do reagente de Folin-Denis, 1,0 ml de solução saturada de carbonato de sódio e completar o volume para 10 ml com água destilada;
5. Agitar os tubos e, após 30 minutos, fazer a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 760 nm.

MÉTODO AZUL DA PRÚSSIA - MARCHA DE DETERMINAÇÃO

1. Colocar 50 ml de água bidestilada em um erlemeyer de 125 ml;
2. Adicionar 0,2 ml da amostra (extrato);
3. Fazer um tubo em branco com 0,2 ml de HCl 1% em metanol, também em erlemeyer de 125 ml, com 50 ml de água bidestilada;
4. Colocar 3 ml de cloreto férrico (0,05M FeCl₃) de um em um minuto e depois colocar 3 ml de ferrocianeto de potássio (0,008M FeK₃CN)⁶;
5. Homogeneizar sempre que se colocar reagente; (Obs.: Coloca-se o cloreto férrico de um em um minuto nos primeiros quatro erlemeyers e volta colocando-se o ferrocianeto de potássio de um em um minuto, sempre agitando ao colocar os reagentes, dando um intervalo de três minutos de uma solução para outra;)
6. Terminar a operação em 23 minutos para 18 tubos;
7. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 720 nm, em absorvância;
8. Zerar o aparelho com água bidestilada;
9. Solução-padrão deve ser preparada com ácido tânico.

CURVA-PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TANINO PELO MÉTODO AZUL DA PRÚSSIA

- 1) Pesar 100 mg de ácido tânico;
- 2) Dissolver 100 ml de HCl 1% em metanol (solução-padrão de ácido tânico);

- 3) Pipetar alíquota de 0 a 1,0 ml, com diferença de 0,1 ml em tubo de ensaio, completando o volume para 10 ml com a solução de HCl 1% em metanol;
- 4) Colocar 50 ml de água bidestilada em erlemeyer de 125 ml e adicionar 0,1 ml da solução de 10 ml preparada anteriormente, para cada um dos pontos da curva-padrão. Para o controle (branco), colocar 0,1 ml de HCl 1% em metanol;
- 5) Adicionar 3,0 ml de cloreto férrico e, após três minutos, adicionar 3,0 ml de ferrocianeto de potássio;
- 6) Fazer a leitura em 720 nm;
- 7) Zerar o aparelho com água bidestilada.

MÉTODO BUTANOL-HCl - MARCHA DE DETERMINAÇÃO

- 1) Usar o mesmo extrato dos métodos anteriores;
- 2) Colocar 7 ml de HCl 30% concentrado em n-butanol (álcool butílico normal) em tubos de ensaio de 15 ml ou tubo de hidrólise;
- 3) Adicionar 0,5 ml do extrato e homogeneizar;
- 4) Colocar nos tubos-controles (brancos) 7 ml da solução preparada com 15% 0,1 N ácido acético, 15% de metanol e 70% n-butanol, acrescentar 0,5 ml da amostra e homogeneizar;
- 5) Deixar os tubos à temperatura ambiente por uma hora;
- 6) Tampar bem os tubos e ferver durante uma hora, esfriar e fazer a leitura em espectrofotômetro a 550 nm;
- 7) Obter solução-padrão a partir de "quebracho" ou "barbatimão"

CURVA-PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TANINO PELO MÉTODO BUTANOL - HCl

- 1) Pesar 1g de tanino purificado;
- 2) Dissolver em 100 ml de solução 1% HCl em metanol;

- 3) Tomar, a partir dessa solução, alíquotas de 0 a 10 ml com intervalos de 1 ml, completando-se o volume para 10 ml com solução de HCl 1% em metanol;
- 4) Colocar, em tubos de ensaio, 7 ml de solução de HCl 30% em n-butanol;
- 5) Adicionar 0,1 ml da solução preparada anteriormente;
- 6) Deixar por uma hora em temperatura ambiente e depois ferver por mais uma hora;
- 7) Fazer a leitura a 550 nm de absorbância;
- 8) Zerar o aparelho com água bidestilada.

MÉTODO VANILINA - HCl - MARCHA DE DETERMINAÇÃO

- 1) Usar o mesmo extrato dos outros métodos;
- 2) Colocar 1 ml do extrato em tubo de ensaio de ± 15 ml;
- 3) Marcar 20 minutos e começar a adicionar 5 ml de solução Vanilina - HCl** em cada tubo, em um intervalo de um em um minuto de um tubo para outro, e homogeneizar;
- 4) Preparo do controle (branco): adicionar 1 ml da amostra em tubo de ensaio e 5 ml de HCl 4% em metanol, de um em um minuto, e homogeneizar;
- 5) Fazer a leitura em espectrofotômetro a 500 nm.

**Solução Vanilina - HCl é resultante da mistura de 8% HCl em metanol mais 2% de Vanilina em metanol e deve ser preparada momentos antes de ser utilizada.

CURVA-PADRÃO DO MÉTODO VANILINA - HCl

- 1) Colocar, em balão volumétrico de 200 ml, 200 mg de catequina e completar o volume com metanol;
- 2) Tomar alíquotas de 5, 10, 25 e 50 ml dessa solução em balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com metanol;
- 3) Para obter a curva-padrão, proceder da mesma maneira indicada para a determinação do tanino nas amostras que foram substituídas por essas soluções.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS COMPARANDO MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE TANINO COM O DESEMPENHO DE AVES

As próximas quatro tabelas mostram parte dos resultados de uma tese de doutorado desenvolvida na Embrapa Milho e Sorgo, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e na Universidade Federal de Lavras. Observam-se, pela Tabela 1, os teores de tanino, em diversos genótipos de sorgo, utilizando os métodos Azul da Prússia, Vanilina/HCl e Butanol/HCl. A existência da testa do grão indica a presença de tanino, o que deveria coincidir com uma porcentagem maior que 0,70% de fenóis totais, no grão. A Tabela 1 mostra, também, uma concordância com relação à presença/ausência de testa com a presença/ausência de tanino, nos métodos utilizados. Exceção se faz apenas para dois genótipos (CMSXS 356 e CMSXS 359), os quais, pelo método Butanol/HCl, apresentaram tanino e, pelas metodologias Azul da Prússia, Vanilina/HCl e presença de testa, o tanino estaria ausente.

Esse tipo de resultado pode acontecer e se deve à dificuldade de se utilizar substâncias adequadas como padrão para quantificar os taninos, principalmente quando se considera que o método Butanol/HCl utiliza o tanino purificado como padrão, o qual apresenta dificuldades em sua extração.

É importante salientar que as diferenças observadas entre o teor de tanino envolvendo as três metodologias se deve ao fato de que cada método detecta uma classe diferente de compostos fenólicos.

Nas Tabelas 2 e 3, observa-se o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar de frangos aos 14 e 28 dias de idade, alimentados com ração de diferentes genótipos de sorgo. Na Tabela 3, também se encontra a digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS). Nota-se que o ganho de peso foi maior para as aves alimentadas com rações contendo sorgo sem tanino. Isso aconteceu aos 14 e aos 28 dias. Esse resultado confirma uma série de outros trabalhos

conduzidos com aves. O consumo de ração de sorgo aos 14 e 28 dias foi semelhante ao da ração do milho BR 106, o qual foi incluído nesse teste para uma comparação padrão. Apesar de o desempenho das aves alimentadas com o sorgo sem tanino BR 300 ter sido superior ao do milho (Tabela 3), convém salientar que aves alimentadas somente com sorgo apresentam ausência de pigmentação (carotenóides).

TABELA 1. Teor de tanino em sorgo, determinado pelos métodos Azul da Prússia (AP), Vanilina/HCl (VA) e Butanol-HCl (BU). Média de quatro repetições. Sete Lagoas, MG. 1996.

Materiais genéticos	Presença de testa no grão	Métodos		
		AP ¹	VA ²	BU ³
BR 300	Não	0,257 b ⁴	0,612, ab	0,793 a
CMSXS 356	Não	0,218 b	0,358 b	1,167 a
BR 600	Sim	2,185 b	7,085 a	7,210 a
BR 304	Não	0,513 a	0,133 a	0,128 a
CMSXS 375	Sim	2,895 c	8,285 a	6,750 b
AG 3001	Sim	1,863 c	5,700 b	7,647 a
A 9902	Sim	1,935 c	5,585 b	6,462 a
CMSXS 376	Sim	2,003 c	4,285 b	5,905 a
CS 111	Sim	1,565 c	4,737 b	5,660 a
CMSXS 359	Não	0,215 b	0,188 b	0,803 a

¹ Equivalente ácido tânico.

² Equivalente catequina.

³ Porcentagem de tanino.

⁴ Médias seguidas da mesma letra, na linha horizontal, não diferem pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Fonte: Rodrigues (1996).

Portanto, esse é um fator que deve ser considerado quando o avicultor fizer o balanceamento da sua ração. A DIVMS (Tabela 3) foi maior para genótipos sem tanino (acima de 90%), quando comparada com aqueles com tanino. Essa diferença se deve principalmente à formação do complexo tanino-proteína.

TABELA 2. Médias do ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de pintos aos 14 dias, para cada material genético avaliado. Média de quatro repetições. Lavras, MG. 1996.

Materiais genéticos	GP	CR	CA
BR 300 ¹	270,02	464,43	1,72
CMSXS 356 ¹	268,56	503,02	1,88
BR 600	202,34	427,48	2,12
BR 304 ¹	257,59	500,22	1,95
CMSXS 375	188,38	504,64	2,68
AG 3001	241,37	475,08	1,97
A 9902	204,54	480,45	2,36
CMSXS 376	237,03	489,59	2,08
CS 111	226,32	491,63	2,18
CMSXS 359 ¹	275,84	471,96	1,70
BR 106 (Milho)	277,23	444,19	1,61

¹Materiais genéticos de sorgo sem tanino no grão.
Fonte: Rodrigues (1996).

Na Tabela 4, encontram-se as correlações entre o tanino, determinado pelos três métodos, e o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar aos 14 e 28 dias e a DIVMS. As correlações para teores de tanino e o ganho de peso das aves foram altas e negativas, sendo que essa associação foi maior aos 28 dias. Azul da Prússia e Vanilina/HCl apresentaram maior correlação que Butanol-HCl. Já as correlações entre tanino e consumo de ração foram baixíssimas, mostrando que o consumo de ração não está associado ao tanino no grão. As correlações entre conversão alimentar e tanino foram altas e positivas. Novamente, Azul da Prússia apresentou os maiores valores. Esse fato se repete quando se compara a DIVMS.

TABELA 3. Médias do ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de pintos aos 28 dias e a digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS) para cada material genético avaliado. Média de quatro repetições. Lavras, MG. 1996.

Materiais genéticos	GP	CR	CA	DIVMS (%)
BR 300 ¹	791,62	1751,82	2,26	94,03
CMSXS 356 ¹	753,64	1846,45	2,46	92,22
BR 600	496,10	1619,72	3,28	79,90
BR 304 ¹	758,49	1869,62	2,47	91,04
CMSXS 375	457,76	1701,40	3,71	79,86
AG 3001	669,25	1839,85	2,75	83,64
A 9902	534,09	1695,34	3,21	84,57
CMSXS 376	666,44	1716,87	2,58	79,33
CS 111	606,92	1683,91	2,78	84,13
CMSXS 359 ¹	782,10	1733,04	2,25	92,31
BR 106 (Milho)	732,92	1730,76	2,36	93,37

¹Materiais genéticos de sorgo sem tanino no grão.

Fonte: Rodrigues (1996).

TABELA 4. Correlações entre o teor de tanino no sorgo, determinado pelos métodos de Azul da Prússia (AP), Vanilina/HCl (VA), Butanol HCl (BU) e o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) conversão alimentar (CA) de pintos aos 14 e 28 dias e a digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS). Lavras, MG. 1996.

Métodos	GP14	GP28	CR14	CR28	CA14	CA28	DIVMS
AP	-0,86	-0,89	-0,02	-0,11	0,70	0,66	-0,94
VA	-0,84	-0,90	-0,12	-0,21	0,64	0,60	-0,89
BU	-0,75	-0,80	-0,10	-0,16	0,55	0,52	-0,91

Fonte: Rodrigues (1996).

MÉTODO PRÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DA EXISTÊNCIA DA TESTA

A existência da testa logo abaixo do pericarpo do grão indica a presença do tanino. Existe um método prático para a determinação da testa que envolve os reagentes hipoclorito de sódio (NaOCl 6%), conhecido como água sanitária, e peletes de hidróxido de potássio (KOH). O preparo da solução KOH/NaOCl deve ser feito com 1,0 g de KOH e 5 ml de NaOCl. Por exemplo, para a análise de dez amostras de sorgo, colocar 100 ml de NaOCl em um erlemeyer de 125 ml, adicionar a barra magnética, pesar 20g de KOH e, vagarosamente, adicioná-lo à água sanitária, misturando até o KOH se dissolver completamente.

O procedimento dessa metodologia envolve os seguintes passos:

- a) Ligar o banho-maria e regular a temperatura entre 60 e 70° C;
- b) Identificar os tubos de ensaio, cada amostra em um tubo;
- c) Colocar 50 grãos para cada amostra;
- d) Adicionar 10 ml da solução KOH / água sanitária em cada tubo;
- e) Colocar os tubos em banho- maria por 15 minutos;
- f) Lavar cada amostra em uma peneira;
- g) Colocar os grãos em papel de filtro;

Observação: Grãos com testa têm cor predominante marrom-escuro, significando presença de tanino, e grãos sem testa têm cor branca/amarela, que seriam aquelas amostras sem tanino no grão.

COMENTÁRIOS FINAIS

Desde o início da década de 70 até os dias atuais, numerosos esforços foram concentrados visando propor um método “confiável” de quantificar os taninos em sorgo. Métodos colorimétricos e aqueles que utilizam a capacidade dos taninos de reagir e precipitar as proteínas apresentam como dificuldade a variação que ocorre entre as moléculas dos compostos fenólicos denominados taninos. Assim, não se consegue uma substância capaz de interagir apenas com os taninos sem a interferência de outras substâncias ou então essa reação ocorre com grupos específicos da molécula de tanino, mas que também pode acontecer com outras moléculas. Dessa forma, ao escolher uma metodologia para determinar taninos em sorgo, deve-se considerar as facilidades na execução do método, a disponibilidade de equipamentos e reagentes no laboratório e também a precisão do método, avaliado em experimentos para esses fins.

Dentro desse contexto, o método Azul da Prússia é o mais confiável, prático, econômico, fácil de ser executado e o que rotineiramente se usa no laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Milho e Sorgo, sendo o mais recomendado para análise de tanino em grãos de sorgo.

AGRADECIMENTOS

A José Eduardo Filho, assistente de pesquisa da Embrapa Milho e Sorgo, a colaboração nas análises laboratoriais para determinação de tanino.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis**. 9.ed. Washington, 1960. p.111.
- BANDA-NYIRENDA, D.B.G.; VOHRA, P.; INGEBRETSON, K.H. Nutritional evaluation of some varieties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Cereal Chemistry**, v.64, n. 6, p.413-417, 1987.
- BULLARD, R. W.; YORK, J. O.; KILBURN, S. R. Polyphenolic changes in ripening bird-resistant sorghums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, p.973-981, 1981.
- BUTLER, L. G. Polyphenols and their effects on sorghum quality. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SORGHUM GRAIN QUALITY, 1981 Patancheru, India. **Proceedings**. Patancheru: India, ICRISAT, 1982_a. p.294-311.
- BUTLER, L. G. Relative degree of polymerization of sorghum tannin during seed development and maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, p.1090-1094, 1982_b.
- BUTLER, L.G. New perspectives on the antinutritional effects of tannins. In: KINSELLA, J. E.; SOUCIE, B., ed. **Foods products**. Champaign: American Oil Chemistry Society, 1989_a. Cap.22, p. 402-409.
- BUTLER, L. G. Sorghum polyphenols. In: CHEEKE, P.R., ed. **Toxicants of plant origin**. Boca Raton: CRC Press, 1989_b. v.4, cap.5, p.95-121.

- BUTLER, L. G. Sorghum polyphenols: Assays and nutritional significance. IN: BIENNIAL GRAIN SORGHUM RESEARCH UTILIZATION CONFERENCE, 1989, Lubbock, **Proceedings**. Lubbock, 1989c. p. 39-42.
- BUTLER, L. G. Tannins and other phenols: effects on sorghum production utilizations. **Intsormil Annual Report**, p.153-156, 1989d.
- BUTLER, L. G. ROGLER, J. Enhancement of high tannin sorghum utilization: characterization, metabolism, and detoxification of sorghum tannins and other polyphenols. In: WINN, J. F., ed. **Intsormil fighting hunger with research**. Lincoln: Intsormil, 1985. p.140-145,.
- BUTLER, L.G.; PRICE, M. P.; BROTHERTON, J. E. Vanillin assay for proanthocyanidins (Condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.30, p. 1090-1094, 1982.
- BUTLER, L. G. RIEDL, D. J.; LEBRYK, D.G.; BLYTT, H. J. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.61, n.5, p.916-920 may, 1984.
- CHIBBER, B. A. K.; MERTZ, E.T.; AXTELL, J. D. Effects of dehulling on tannin content, protein distribution, and quality of high and low tannin sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n.3, p. 679-683, 1978.
- EARP, C.F.; AKINGBALA, J. O.; RING, S.H.; ROONEY, L. W. Evaluation of several methods to determine tannins in sorghum with varying kernel characteristics. **Cereal Chemistry**, v. 58, n. 3, p.234-238, 1981.

- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L. G. Condensed tannin purification and characterization of tannin associated proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p.947-952, 1980b.
- HAHN, D. H.; ROONEY, L. W.; EARP, C.F. Tannins and phenols of sorghum. **Cereal Foods World**, v. 29, n. 12, p. 776-779, 1984.
- PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.
- PRICE, M. L.; SCOYOC, A.V.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.
- RODRIGUES, W. A. **Variabilidade para teor de tanino em sorgo (*Sorghum bicolor* L.), seu controle genético e associação com a resistência a pássaros**. Lavras: UFLA, 1991. 72p. Tese Mestrado.
- RODRIGUES, W. A. **Tanino em sorgo: métodos de determinação e análise genética**. Piracicaba: ESALQ, 1996. 81 p. Tese Doutorado.
- RODRIGUES, W. A.; MAGALHÃES, P.C.; SANTOS, F. G.; TOSELLO, A. Análise de um cruzamento dialélico parcial para teor de tanino em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Pesquisa Agropecuária Brasileira, no prelo.

RODRIGUES, W. A.; MAGALHÃES, P.C.; SANTOS, F. G.; BETERCHINI, A.G.; TOSELLO, A. Comparações entre métodos para determinar a presença de taninos em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Revista Ciência e Agrotecnologia. UFLA - Lavras, MG. No prelo.

ROSTAGNO, H.S.; FEATHERSTON, W. R.; ROGLER, J. C. Studies on the nutritional value of sorghum grains with varying tannin contents for chicks. 2. Amino acid digestibility studies. **Poultry Science**, v.52, p.772-778, 1973a.



Embrapa

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*