

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DE TANINOS Y ANALISIS
BROMATOLOGICO PROXIMAL DE CUATRO DIFERENTES MEZCLAS DE
FORRAJES A BASE DE GRAMINEAS Y LEGUMINOSAS**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

VERONICA CARMINA DARDON ORELLANA

MARIO ERNESTO DURAN CONTRERAS

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2011

SAN SALVADOR. EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS: QUIMICA AGRICOLA

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: TOXICOLOGIA Y QUIMICA LEGAL

Licda. María Luisa Ortiz de López

DOCENTES DIRECTORES

MSc. María Elisa Vivar de Figueroa

Licdo. Freddy Alexander Carranza Estrada

Ing. Juan Milton Flores Tensos

AGRADECIMIENTOS

A nuestros docentes directores, MSc. María Elisa Vivar de Figueroa, Lic. Freddy Alexander Carranza e Ing. Juan Milton Flores Tensos por su paciencia, empeño y dedicación para hacer posible la realización de este trabajo de investigación.

A Jorge Carranza, por su colaboración en la traducción de la metodología analítica utilizada para la cuantificación de taninos.

A la Coordinadora General de Trabajos de Graduación, Licda. Odette Rauda por su colaboración en la realización de nuestro trabajo de graduación y a nuestras asesoras de área MSc. Ena Herrera y Licda. María Luisa de López por sus observaciones, consejos y tiempo brindado para la presentación de nuestro trabajo de graduación.

A la jefe de la Unidad de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Licda. Ada Yanira de Linares por brindarnos su valioso apoyo para la realización de la parte experimental de nuestro trabajo de graduación, así como también al Licdo. Norbis Solano, Don Nerio y Doña Mercedes por su colaboración.

DEDICATORIA

A Dios por hacerme posible obtener este logro importante en mi vida y ser mi guía para llevar a cabo mis metas.

A mis amados padres por ser mi apoyo incondicional y mi motivación para terminar este proposito que llena de satisfacción mi vida.

A mí amado Luis por su apoyo y paciencia en todo momento para culminar esta meta y por estar a mi lado siempre.

A mis hermanos (Mirna, Néstor y Rafa) por su ayuda y apoyo siempre que lo necesito y porque son los mejores hermanos.

A mi amigo Marito Duran por soportarme, apoyarme y hacer posible terminar mi carrera te agradezco un montón y sabes que aun en la distancia siempre te voy a querer mucho.

A mis amigas Tania y Sandra por su apoyo, ayuda y colaboración ya que en todo momento recibí su de ustedes lo mejor cuando las necesite las quiero un monton niñas

A MSc. María Elisa Vivar de Figueroa por su dedicación, empeño y apoyo y por ser parte de este trabajo porque sin usted nada hubiera sido posible mil gracias lic.

A Mis docentes directores Ing. Milton Flores Tensos y Lic. Freddy Alexander Carranza por su tiempo, paciencia, apoyo, confianza y consejos que me ayudaron en todo momento y por ser los mejores asesores que pudimos tener muchísimas gracias

VERONICA DARDON

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por haberme dado la oportunidad de nacer y ser una persona de provecho para la humanidad en general,

A mi padre (Mario) por tomarse el tiempo de sentarse y aconsejarme en lo que sería bueno y malo para mi vida y por el apoyo brindado a lo largo de mi carrera que con sus experiencias ganadas en la vida me empujó a seguir adelante.

A mi madre (Lorena) por su amor, cariño, comprensión, apoyo incondicional que me ayudo a seguir adelante, por aconsejarme a través de la distancia y tomarse el tiempo y dedicación para que culminara mis estudios superiores ya que sin su presencia esto no hubiera podido ser posible. Mami este triunfo va en tu honor. Te amo.

A mi hermana (Lorena) por el apoyo y confianza brindada para que fuera posible la culminación de uno de mis primeros logros, mis estudios superiores.

A mi sobrinita (Pamela) ya que gracias a mi hermana y a Dios me han dado la dicha de conocer al pedacito de gente que ha cambiado la frecuencia de mi familia, y en lo particular con sus sonrisas y sus palabras “Tío Mayo” me empujaron a seguir adelante.

A mi familia a mis abuelas, tíos, tías, primos, primas, sobrinos y sobrinas por su apoyo en todo momento bueno y malo que sufrí para luego llegar a culminar mis estudios, muchas gracias por llevarme siempre en sus oraciones.

A mi amiga y compañera de tesis (Verónica Dardón) por todo el apoyo, interés, dedicación y confianza puesta en mí para la realización de este trabajo de graduación, gracias por todo. Te quiero mucho DARDON

A mis amigos (Irene, Tania, Julieta, Roberto, Miguel, Mauricio, Tere) porque de una manera u otra aportaron su granito de arena con consejos, y por el apoyo que me brindaron en situaciones tanto malas como buenas ocurridas en el transcurso de mi carrera. Muchas gracias.

A mis docentes directores Mae. María Elisa Vivar de Figueroa, Lic. Freddy Alexander Carranza e Ing. Juan Milton Flores Tensos por los consejos, dedicación, confianza brindado a nosotros para la realización de un excelente trabajo de graduación.

Me falta mencionar muchas personas que de alguna u otra manera aportaron su granito de arena para que concluyera con éxitos mis estudios superiores, a todos ellos muchísimas gracias y que Dios los bendiga siempre.

MARIO DURAN

INDICE

	PAGINA
Abreviaturas	
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xix
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	23
3.1 Forrajes	23
3.2 Ensilados	25
3.3 Valor Nutritivo de los Forrajes	27
3.4 Factores que afectan la utilización de la proteína y deprimen la digestión	28
3.4.1 Taninos	28
3.5 Efectos de taninos condensados en la alimentación animal	32
3.6 Taninos condensados en forrajes a base de gramíneas y leguminosas	35
3.7 Nutrientes importantes en la alimentación del ganado	37
3.8 Generalidades botánicas de las especies en estudio	39

Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	47
4.1 Tipo de estudio	47
4.2 Investigación bibliográfica	48
4.3 Investigación experimental	48
4.4 Preparación de la muestra	50
4.5 Preparación de extracto de taninos	51
4.6 Métodos de cuantificación de taninos	52
4.7 Análisis bromatológico proximal	57
4.8 Análisis estadístico	76
Capitulo V	
5.0 Discusión y Resultados	79
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	104
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	107
Bibliografía	109
Glosario	119
Anexos	124

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Tabla de las características agronómicas de las variedades de Sorgo (*Sorghum bicolor*)
2. Mapa de ubicación geográfica del ensayo.
3. Análisis Bromatológico Proximal.
4. Equipo, materiales y reactivos para los análisis de cuantificación de taninos y análisis bromatológico proximal.
5. Marchas para los análisis métodos de cuantificación de taninos y análisis bromatológico proximal.
6. Cuadro de resultados de cuantificación de taninos por dos métodos espectrofotométricos y análisis bromatológico proximal.
7. Datos teóricos para obtener curva de calibración de ácido tánico
8. Cuadros de curvas de calibración.
9. Tablas promedio de cuantificación de taninos por dos métodos espectrofotométricos de microensilados elaborados a base de una gramínea sorgo (*sorghum bicolor*) y dos leguminosas frijol espada/canavalia (*canavalia ensiformis*) y frijol mono (*vigna sinensis*)
10. Ejemplos de la realización de cálculos para la cuantificación de taninos por dos métodos espectrofotométricos, análisis bromatológico proximal y análisis estadístico de las muestras de forrajes a base de una gramínea sorgo (*sorghum bicolor*) y dos leguminosas frijol espada/canavalia (*canavalia ensiformis*) y frijol mono (*vigna sinensis*).
11. Tablas estadísticas de distribución F.

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° Pág.
1. Resultados de cuantificación de taninos totales por método de Folin Ciocalteu	81
2. Resultados de cuantificación de taninos condensados por método de Proantocianidinas (HCl- Butanol)	84
3. Resultados de la calidad nutricional de las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones por el método de Wendee.	86
4. Resultados de la calidad nutricional de las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones por el método de Van Soest.	87

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° Pág.
1. Proceso de reacción de formación de taninos hidrolizables	30
2. Proceso de reacción de formación de Proantocianidinas	31
3. <i>Canavalia ensiformis</i>	39
4. Planta entera de <i>Canavalia ensiformis</i>	40
5. <i>Vigna sinensis</i>	41
6. Planta entera de <i>Vigna sinensis</i>	41
7. <i>Sorghum bicolor</i>	43
8. <i>Sorghum bicolor</i> variedad CENTA S-2	45
9. <i>Sorghum bicolor</i> variedad CENTA RCV	45
10. Recolección de muestras de forraje ensilado	79
11. Preparación de la muestra	80
12. Preparación del extracto	80
13. Porcentaje de taninos totales en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)	82
14. Porcentaje de taninos condensados en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)	85
15. Porcentaje de materia seca en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna).	88
16. Porcentaje de Proteína cruda en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y	90

Vigna).	
17. Porcentaje de Extracto etéreo en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna).	92
18. Porcentaje de Fibra cruda en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna).	93
19. Porcentaje de cenizas en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna).	95
20. Porcentaje de Extracto libre de Nitrógeno en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna).	96
21. Porcentaje de Fibra Neutro detergente en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna).	98
22. Porcentaje de Fibra ácido detergente en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna).	99

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pág.
1. Mezclas y proporciones de los que está constituido cada uno de los forrajes que serán utilizados para alimento de ganado vacuno.	50
2. Cuantificación del número de análisis a realizar por cada tratamiento según el número de muestras	77
3. Análisis de varianza para la concentración de Taninos totales en las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones.	101
4. Análisis de varianza para la concentración de Taninos condensados en las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones.	101

Abreviaturas

C: cenizas

CLAIS: comisión latinoamericana de investigadores de sorgo

CO₂: Dióxido de carbono

CO: monóxido de carbono

FAD: Fibra ácido detergente

FND: Fibra neutro detergente

FC: Fibra cruda

HCl: Ácido Clorhídrico

HP: Humedad parcial

HT: Humedad total

TH: Taninos hidrolizables

TC: Taninos condensados

MS: Materia seca

N: Nitrógeno

PA: Proantocianidinas

PC: Proteína cruda

PVPP: Polivinilpirrolidona

SO₂: Dióxido de azufre

SO₃: Trióxido de azufre.

RESUMEN

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, en el Laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y en la Asociación Cooperativa Astoria; en el que se cuantificó el contenido de taninos (factores antinutricionales que tienen la característica principal de formar macromoléculas con las proteínas y precipitarlas) y además se evaluó el contenido nutricional de cuatro diferentes mezclas de forrajes a base de una gramínea, Sorgo (***Sorghum bicolor***) en sus variedades CENTA S-2 Y CENTA RCV y dos leguminosas, Frijol Espada/Canavalia (***Canavalia ensiformis***) y Frijol Mono (***Vigna sinensis***) en cuatro diferentes proporciones (80:20), (70:30), (60:40), (50:50).

La cuantificación de taninos se realizó por medio de dos métodos espectrofotométricos (Método de Folin Ciocalteu para taninos totales y Método de Proantocianidinas o HCl-Butanol para taninos condensados) y se evaluó el contenido nutricional para cada una de las mezclas y proporciones por medio del análisis bromatológico proximal y para cada uno de estos análisis los resultados obtenidos mostraron que a medida que se aumentó la proporción de gramínea (***Sorghum bicolor***) en las mezclas de 50 a 80%, se observó un aumento en el contenido de taninos totales; donde, los mayores porcentajes son los presentados por la mezcla de forraje Sorgo (***Sorghum bicolor***) CENTA S-2 + Frijol Mono (***Vigna sinensis***) (S-2+V), en las proporciones (70:30) y (80:20); la que presentó menor porcentaje de taninos totales fue Sorgo (***Sorghum bicolor***) CENTA S-2 + Frijol Espada/Canavalia (***Canavalia ensiformis***) (S-2+C) en la proporción (50:50), por lo que ninguna de las mezclas evaluadas sobrepasaron el valor permitido de taninos que según estudios anteriores se reporta un límite que va de 2–4%, y además se observó que en cada una de las diferentes mezclas y proporciones no existe mucha

variación en cuanto al contenido nutricional, por lo que el alimento no se ve afectado por la presencia de taninos es por esto que se concluye que el contenido de taninos que podría dar lugar a la formación de un complejo tanino-proteína así como también dar lugar al poco aprovechamiento de estas por parte del ganado lechero no causaría ningún efecto negativo en la alimentación del ganado por encontrarse en muy bajas concentraciones (0.2272-3.055% para taninos totales y 0.094-0.202% para taninos condensados) y por tanto no se vería afectada aceptación y digestibilidad del alimento por parte del ganado lechero por el bajo contenido de taninos en las mezclas. Pudiéndose de esta manera mejorar los niveles de producción láctea del ganado lechero de la Asociación Cooperativa Astoria.

Por otro, lado no se encontraron variaciones significativas entre las medias de las concentraciones de taninos condensados por haber encontrado valores de F calculado menores a los de F tabla (3.41), con un nivel de significancia del 95%.

Es por dicho motivo que esta investigación puede aportar a la Cooperativa ASTORIA que se evalúen estas mezclas de forrajes a través del consumo voluntario para poder ser utilizadas como alimento para el ganado ya que su asocio presenta efectos positivos en cuanto a contenido proteico de fibra y su bajo contenido de taninos no causarían efectos negativos en el ganado lechero, con lo que se mejoraría dieta del ganado lechero a un menor costo, debido a la incorporación de leguminosas a sus dietas a base de gramíneas de alto costo.

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCION

El presente trabajo se llevo a cabo en la asociación cooperativa astoria ubicada en el departamento de La Paz, municipio de San Pedro Masahuath durante tres meses del año 2011, para lo que se recolectaron muestras de forrajes (almacenados como ensilados) y se elaboraron mezclas en cuatro diferentes proporciones (80:20), (70:30), (60:40), (50:50); a base de dos leguminosas: El frijol canavalia (*Canavalia ensiformis*) y el frijol vigna (*Vigna sinensis*) y una gramínea: el Sorgo (*Sorghum bicolor*) de las variedades Centa RCV y Centa S-2.

A cada una de las mezclas y proporciones se le cuantifico el contenido de taninos presente por medio de dos métodos espectrofotométricos el método de follin ciocalteu y método de proantocianidinas (HCl-BUTANOL) y el valor nutritivo del alimento por medio de un análisis bromatológico proximal que comprende los análisis de Método de Wendee contenido de materia seca, proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda, cenizas y extracto libre de Nitrógeno; y además el Método de Van Soest que comprende Fibra neutro detergente y Fibra acido detergente, dichos análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Química Agrícola de la facultad de Ciencias Agronómicas y en el laboratorio de de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Y los resultados obtenidos fueron comparados partir de un diseño estadístico con lo que se determino que mezcla y proporción es la más favorable para la alimentación del ganado lechero con lo que se dio una respuesta a la problemática de la Asociación Cooperativa Astoria para mejorar la calidad de alimentación del ganado lechero.

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Cuantificar espectrofotométricamente los taninos y análisis bromatológico proximal en cuatro diferentes mezclas de forrajes a base de leguminosas y gramíneas.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Preparar cuatro mezclas de forrajes (micrósilos o microensilados) a base de una gramínea y dos leguminosas en proporciones de (80:20), (70:30), (60:40) y (50:50).

2.2.2 Determinar el contenido de taninos por el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu en las diferentes mezclas de forrajes a base de una gramínea y dos leguminosas en las proporciones de (80:20), (70:30), (60:40) y (50:50).

2.2.3 Determinar el contenido de taninos por el método espectrofotométrico de Proantocianidinas (HCl - BUTANOL) en las diferentes mezclas de forrajes a base de una gramínea y dos leguminosas en las proporciones de (80:20), (70:30), (60:40) y (50:50).

2.2.4 Determinar el valor nutritivo de las diferentes mezclas de forrajes por medio del análisis bromatológico proximal por método de Wendee y método de Van Soest.

2.2.5 Comparar el contenido de taninos a partir de un diseño estadístico que permita recomendar cuál de las mezclas y proporciones es más favorable para la alimentación del ganado lechero.

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO

La Asociación Cooperativa Astoria, se encuentra ubicada en Cantón Las Flores, Municipio de San Pedro Masahuat, departamento de La Paz, es un conglomerado de 80 miembros que se formó durante el periodo de la reforma agraria pero es una de las pocas asociaciones que continúan trabajando con éxito. En dicha Cooperativa se trabaja con 160 cabezas de ganado aproximadamente, especialmente vacas de encaste Holstein con Brown Swiss, con las cuales según el presidente de dicha cooperativa, actualmente logran una producción de entre mil cien a mil doscientas botellas de leche diarias, con un promedio de 18 botellas por vaca y esperan invertir y mejorar el manejo y los niveles de elaboración de productos lácteos, a fin de ser más productivos en esa actividad se ven en la necesidad de incorporar a la dieta del ganado a base de gramíneas que proporcionan un alimento de baja calidad diferentes mezclas con leguminosas para la preparación de forrajes (ensilados), con lo que se busca aportar los nutrientes necesarios para un buen desarrollo y un aumento en la producción láctea (ver anexo N°2).

3.1 FORRAJES

Los forrajes son partes vegetativas de las plantas que se utilizan como alimento para el ganado lechero. Pueden ser pastoreados directamente, o cosechados y preservados como ensilaje o heno. Según la etapa de lactancia de las vacas, pueden contribuir desde casi 100% (en vacas no-lactantes) hasta no menos de 30% (en vacas en la primera parte de lactancia) de la materia seca en la ración. ⁽⁵⁹⁾Desde un punto de vista nutricional, los forrajes pueden variar entre alimentos muy buenos (pasto joven y succulento, leguminosas en su etapa vegetativa) a muy pobre (pajas y ramoneos).

Las características generales de forrajes son los siguientes:⁽⁵⁹⁾

- Volumen: El volumen limita cuanto puede comer la vaca. La ingestión de energía y la producción de leche pueden ser limitadas si hay demasiado forraje en la ración. Sin embargo, alimentos voluminosos son esenciales para estimular la ruminación y mantener la salud de la vaca.
- Alta Fibra y Baja Energía: Los forrajes pueden contener desde 30 hasta 90% de fibra (FND). En general, entre más alto es el contenido de fibra del forraje, más bajo es su contenido de energía.
- Contenido de proteína es variable: Según la madurez, las leguminosas pueden tener de 15 a 23% de proteína cruda y las gramíneas contienen entre 8 y 18% de proteína cruda (según el nivel de fertilización con nitrógeno) y los residuos de cosechas pueden tener solo de 3 a 4% de proteína cruda (paja).

Los forrajes son requeridos en la dieta en una forma física gruesa porque contribuyen significativamente a:

- Estimular la ruminación y la salivación, procesos importantes para mantener un ambiente sano en el rumen.
- Estimular las concentraciones del rumen y la tasa de salida de la digesta del rumen, que en su turno mejora la eficiencia del crecimiento de las bacterias del rumen.
- Evitar la depresión de grasa en la leche, que puede resultar cuando los alimentos tienen una proporción muy alta de concentrados. Las raciones que contienen menos de 35% de forraje resultan en la producción de leche con un bajo contenido de grasa.

Existen varias maneras de almacenamiento y conservación de forrajes:

- La vía seca cuyo resultado es el heno. La conservación es posible gracias a la desecación, bien únicamente bajo la acción del sol (secado natural) o complementándose con aire caliente producido por quemadores que llevan a

un porcentaje de humedad de alrededor del 15% en el forraje, lo que asegura su estabilidad. (38)

- La vía húmeda llamada “ensilado”, que se aplica tanto a las gramíneas forrajeras como al maíz y, eventualmente, a subproductos alimenticios como la pulpa de remolacha, los bagazos de cerveza, etc. Es difícil tener éxito con algunos forrajes como la alfalfa, bajos en azúcares y con alto contenido en nitrógeno soluble, que produce malos olores. (38)

3.2 ENSILADOS

El ensilado es un proceso de conservación del forraje está basado en una fermentación láctica del pasto que produce ácido láctico y una disminución del pH por debajo de 5.

El ensilado permite retener las cualidades nutritivas del pasto original mucho mejor que el henificado, pero precisa de mayores inversiones y conocimientos para conseguir un producto de calidad.

El ensilaje impiden que el producto se descomponga o pudra, permitiendo la conservación de sus propiedades alimenticias, por un determinado tiempo, de tal forma que pueda ser utilizado en el momento que se necesite (4). Permite retener las cualidades nutritivas del pasto, pero precisa de mayores inversiones y conocimientos para conseguir un producto de calidad.

El proceso de ensilaje comprende tres fases:

- Respiración
- Fermentación
- Estabilización

Respiración: se debe eliminar completamente el aire del forraje ensilado por medio de un proceso de compactación para impedir el crecimiento de bacterias y hongos que provocarían la pérdida de proteína y mal sabor que se debe generalmente a hongos. ⁽³⁹⁾

Fermentación La fermentación comprende una serie de cambios químicos producidos en los compuestos orgánicos, por la acción de diferentes organismos. Dentro de los productos que se forman se destacan el ácido láctico, acético y butírico, siendo el primero el más importante y predominante en un buen ensilado; también está presente el nitrógeno amoniacal en una misma proporción. ⁽³⁹⁾

Estabilización Las etapas de respiración y fermentación alcanzan un máximo de 3 días, por lo que la producción de ácido láctico generando un pH inferior a 4.5, completándose la fermentación en un máximo de 21 días ⁽³²⁾. Los ensilados puede tener una fermentación inadecuada al producir ácido butírico y otros productos indeseables como amonio y pequeñas proteínas llamadas aminos. Las especies de *Clostridium* son las bacterias más comunes productoras de ácido butírico responsables de esta fermentación indeseable. Si el ensilado contiene una cantidad adecuada de carbohidratos fácilmente disponibles, la fermentación del microsilos no tomara este rumbo. Las características de un ensilado que ha tenido fermentación butírica incluyen pH arriba de 5.0, altos niveles de nitrógeno amoniacal, mas ácido butírico que láctico y un fuerte olor desagradable. Las vacas alimentadas con estos silos comen menos o dejan de comer, producen menos leche y tienen una incidencia incrementada de enfermedades metabólicas como cetosis o displasia de abomaso. ⁽³⁸⁾

3.3 VALOR NUTRITIVO DE LOS FORRAJES

Se ha reportado que el valor nutritivo de los forrajes está determinado por su composición química, pero el valor nutritivo propio del alimento está influenciado por un gran número de factores que pueden afectar la eficiencia con la cual los rumiantes utilizan estos forrajes y además que no dependen solo de la digestibilidad del forraje sino también del consumo voluntario que se ve influenciado por la palatabilidad, variación estacional y disponibilidad ⁽¹⁹⁾

Un aspecto que afecta el consumo y la digestibilidad de los componentes de los forrajes, y que es muy marcado en las especies leguminosas tropicales es la presencia de metabolitos secundarios, que se encuentran presentes en una gran cantidad de leguminosas arbóreas y arbustivas tropicales con potencial forrajero y son denominados también factores antinutricionales, entre los que se encuentran: taninos, saponinas, fitatos, hemaglutininas, aminoácidos tóxicos (canavanina y mimosina), glucósidos cianogénicos, cumarina, flavonol, diversos tipos de fenoles e inhibidores de proteasas. ⁽¹⁹⁾

Estos factores antinutricionales son sustancias naturales no fibrosas generadas por el metabolismo secundario de las plantas, como un mecanismo de defensa ante el ataque de mohos, bacterias, insectos y pájaros, o en algunos casos, productos del metabolismo de las plantas sometidas a condiciones de estrés, que al estar contenidos en ingredientes utilizados en la alimentación de animales ejercen efectos contrarios a su óptima asimilación, reduciendo el consumo e impidiendo la digestión, la absorción y la utilización de nutrientes por el animal. La acción de los factores antinutricionales no sólo consiste en interferir con el aprovechamiento de los nutrientes sino que en varios casos promueve pérdidas importantes de proteína endógena y en algunos casos produce daños al organismo del animal que los consume. ⁽¹⁹⁾

La presencia de algunos de estos factores pueden alterar la utilización de los nutrientes, la conversión alimenticia y por ende la productividad de los animales; también reporta cuatro grupos en los cuales se dividen los diferentes factores antinutricionales:

- Factores que afectan la utilización de la proteína y deprimen la digestión (taninos, saponinas).
- Quelatantes (oxalatos, fitatos, glucosinolatos).
- Antivitaminas (antivitamina A, antivitamina E, antivitamina D, dicumarol).
- Otros tóxicos (aminoácidos tóxicos -mimosina, canavanina-, nitratos). ⁽¹⁹⁾

3.4 FACTORES QUE AFECTAN LA UTILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Y DEPRIMEN LA DIGESTIÓN

Los taninos son, los compuestos que revisten una mayor importancia en las leguminosas forrajeras en el trópico, no solo por su diversidad y concentración, sino también por sus múltiples efectos en la dinámica digestiva de los animales y la utilización de la proteína. Así, la literatura reporta un sinnúmero de publicaciones donde los efectos de la suplementación con forrajes que tienen taninos, son de efectos variados. En muchos casos el efecto en el animal va a depender de la concentración en la planta y del nivel de suministro del forraje que los contiene, en la dieta del animal. ⁽¹⁹⁾

3.4.1 TANINOS

- Definición y características

Se definen como compuestos fenólicos de alto peso molecular (500-3000 Daltons) que contienen suficientes hidroxilos y otros grupos (como los carboxilos) que les permiten formar complejos fuertes con proteínas y otras

macromoléculas (almidones, celulosas y minerales) bajo particulares condiciones ambientales ⁽⁷⁾, que forman parte de los productos naturales y están ampliamente distribuidos en muchos vegetales incluyendo árboles, frutas y pastos.

Los taninos poseen acción astringente; forman dispersiones coloidales y compuestos insolubles con ciertos tejidos animales, precipitan el alcaloide de sus soluciones, así como los colorantes orgánicos de carácter básicos y la albúmina; en soluciones alcalinas absorben fácilmente oxígeno y se oscurecen. Son bastante solubles en alcohol diluido, pero poco solubles en alcohol deshidratado, pero bastantes y en acetona no cristalizables y por ello difíciles de separar las mezclas polifenólicas. Los taninos son sustancias amorfas que con el agua forman coloides de reacción ácida y sabor muy acre. Suelen ser solubles en alcohol.

- Clasificación

Los taninos pueden dividirse en dos grupos:

a) Taninos hidrolizables o pirogálicos

Están formados por varias moléculas de ácido gálico y egálico unidos por un enlace éster y un residuo de glucosa. Se conoce con el nombre de taninos pirogálicos porque cuando se destilan en seco producen ácido gálico y como su nombre lo indica pueden ser hidrolizados fácilmente por ácidos minerales.

Los taninos hidrolizables (HT) son moléculas con un núcleo central polyol (generalmente D-glucosa) los grupos hidroxilos de estos carbohidratos son parcial o totalmente esterificados con grupos fenólicos como el ácido gálico (galotaninos) o ácido elagico (elagitaninos) los taninos hidrolizables usualmente están presentes en las plantas en bajas cantidades. ⁽⁷⁾

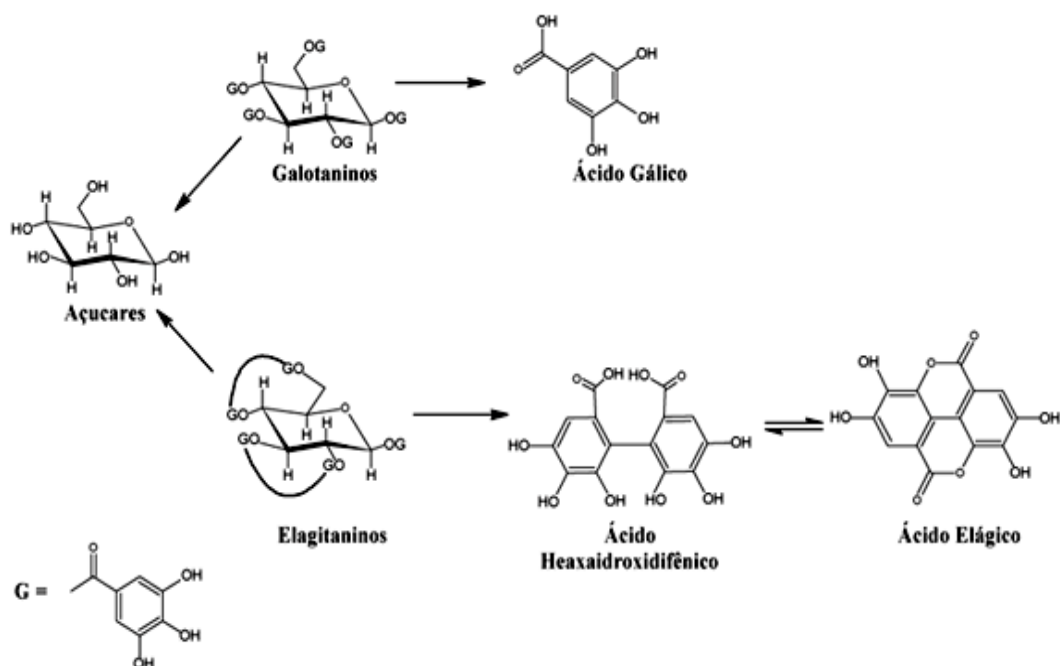


Figura N°1. Proceso de reacción de formación de taninos hidrolizables

b) Taninos condensados

Son polímeros fenólicos de alto peso molecular que no son fácilmente hidrolizables y tienden a polimerizarse a productos insolubles amorfos especialmente en presencia de ácidos minerales. Se considera que sus precursores son las catequinas o derivados de flavan-3-ols que se sintetizan a partir de combinaciones con ácido shikímico. (7). Son además oligómeros o polímeros de unidades de flavonoides (flavan 3-ol) unidas por uniones carbono-carbono no susceptibles de dividirse por hidrólisis.

Las proantocianidinas son más comúnmente llamadas taninos condensados debido a su estructura química condensada, y se encuentran más ampliamente distribuidos que los taninos hidrolizables, aunque estos últimos sufran también reacciones de condensación (7). El término proantocianidinas se deriva de la reacción de oxidación por catálisis ácida que produce color

rojo por las antocianidinas al sobrecalentar las proantocianidinas en una solución alcohólica.

Las Proantocianidinas pueden contener de 2 a 50 unidades o más de flavonoides. Los polímeros de PA tienen complejas estructuras porque las unidades flavonoides pueden diferir de algunos sustitutos y por la variación de los sitios de las bandas interflavan. (7)

Las uniones carbono - carbono de los taninos condensados no son divididas o separadas por hidrólisis, estos pueden o no ser solubles en solventes orgánicos acuosos dependiendo de su estructura química y el grado de polimerización de la molécula y son hidrolizados por ácidos o bases débiles produciendo carbohidratos y ácido fenólico, bajo estas condiciones los taninos condensados no son hidrolizados; en cambio Los taninos hidrolizables se hidrolizan por agua caliente o enzimas como por ejemplo la Tanasa. (7)

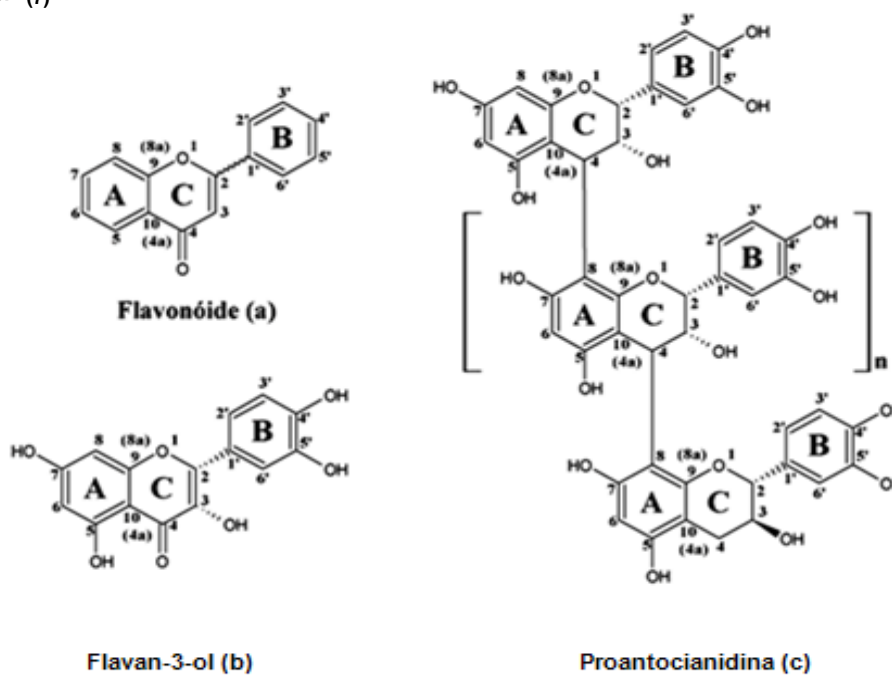


Figura N° 2 Proceso de formación de proantocianidinas

3.5 EFECTOS DE TANINOS CONDENSADOS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

- a) Efectos nutricionales
- b) Efectos antinutricionales
- c) Efectos sobre el valor nutritivo de los forrajes

a) EFECTOS NUTRICIONALES

La capacidad de los taninos condensados (TC) para unirse a otras moléculas constituye el aspecto más importante para comprender los efectos que se les atribuyen sobre los procesos de digestión. Debido a su estructura química poseen la capacidad de unirse a diferentes compuestos como proteínas, polisacáridos, minerales, carbohidratos, celulosa, células de las membranas bacterianas y enzimas involucradas en la digestión de los compuestos antes mencionados. ⁽¹⁴⁾

Durante estos procesos, los taninos pueden tener efectos negativos sobre el valor nutritivo de los forrajes según la concentración en la que se encuentren. Así, a altas concentraciones, 6-10% de la materia seca deprimen el consumo voluntario y la palatabilidad de las especies forrajeras. También reducen la digestibilidad: de la materia seca, de la materia orgánica, de la fibra, de la proteína, y de los carbohidratos y por consiguiente afectan negativamente el desempeño productivo de los animales. ⁽¹⁴⁾

En moderada y baja concentración, (2-4 % de la MS), su efecto es beneficioso, previenen infecciones y aumentan la distribución de nitrógeno no amónico y de los aminoácidos esenciales desde el rumen. La concentración de los taninos en

la dieta, con un rango de valores medidos que variaron entre 0 - 12 % de MS, presentaron respuesta lineal y positiva en la formación de complejos taninos-proteínas. ⁽¹⁴⁾

b) EFECTOS ANTINUTRICIONALES

- Efectos sobre el consumo

La presencia de taninos condensados en leguminosas puede disminuir el consumo de las mismas por actuar sobre la palatabilidad de estas especies, afectando la digestión. La formación de complejos entre las proteínas salivales y taninos provoca una sensación de astringencia que puede aumentar la salivación disminuyendo la palatabilidad de las especies. Sin embargo, estos efectos parecen estar más sujetos a los efectos propios del funcionamiento del rumen y del intestino. Los taninos condensados parecen reducir la tasa de fermentación provocando efectos sobre el llenado del rumen, hasta situaciones más severas en las que se reduce la digestión de la fibra y del nitrógeno. También pueden reducir la digestibilidad de las células de la pared por adherirse a enzimas bacterianas o por formar complejos indigestibles con carbohidratos estructurales. ⁽¹⁴⁾

Experimentalmente estos efectos pueden revertirse cuando se le suministra PEG (propilenglicol) a la dieta de los animales afectados que actúa evitando la formación de complejos con los taninos de la dieta y evitando que estos se unan a las proteínas, siempre que se realice dentro de los treinta minutos posteriores a la formación de los complejos. ⁽¹⁴⁾

c) EFECTOS SOBRE EL VALOR NUTRITIVO DE LOS FORRAJES

En general los forrajes con una elevada concentración de taninos condensados se asocian con la baja palatabilidad, bajo consumo y un escaso desempeño productivo de los animales afectados. Si bien el bajo consumo puede ser

consecuencia de una disminución de la palatabilidad, también podría ser debido a un desmejoramiento de la función ruminal, o a una disminución del apetito originada por una baja concentración de nitrógeno. ⁽¹⁴⁾

Los taninos tienen su mayor impacto en la nutrición animal por la habilidad para formar complejos con numerosas moléculas tales como: carbohidratos, proteínas, polisacáridos, membranas de las células bacterianas, enzimas involucradas en la digestión de carbohidratos y proteínas. ⁽⁷⁾

Los taninos presentan distintos efectos en la alimentación animal:

1. Deprimen el consumo voluntario
2. Forman complejos con proteínas ⁽³²⁾

El principal efecto negativo del uso de taninos es el déficit de la digestibilidad. Los taninos ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad de una serie de enzimas como proteasas, lipasas, α -amilasas, celulasas, β -glucosidasas y ureasas, por lo que se puede afirmar que deprimen la digestibilidad del alimento. ⁽³²⁾

Los taninos también inhiben la proteína en el rumen disminuyendo las concentraciones de amonio, lo que indica una inhibición de enzimas proteolíticas. Hay indicaciones de que los taninos forman enlaces con carbohidratos (celulosa, hemicelulosa, almidón y pectina), pero éstos no son dependientes del pH. En algunos estudios se demostró que la formación de ácidos grasos volátiles y de gas en condiciones ruminales fue menor con alto contenido en taninos, por lo que la degradación de la materia seca fue menor. Los resultados negativos de la degradación comenzaron al sobrepasar el 4% de sustancias inhibitorias en la ración. ⁽³²⁾

3.6 TANINOS CONDENSADOS EN FORRAJES A BASE DE GRAMINEAS Y LEGUMINOSAS

Forrajes de alta calidad pueden constituir dos tercera partes de la materia seca en la ración de vacas, que comen 2.5 a 3% de su peso corporal como materia seca (ejemplo, una vaca de 600 kg. puede comer 15 a 18 kg. de materia seca en un forraje bueno). Las vacas comen más de una leguminosa que de una gramínea en la misma etapa de madurez. Sin embargo, forrajes de buena calidad, alimentados en raciones balanceadas, suministran mucho de la proteína y energía necesarias para la producción de leche. ⁽³²⁾

Las condiciones de suelos y clima típicamente determinan los tipos de forrajes más comunes en una región. Tanto gramíneas y leguminosas son ampliamente conocidos alrededor del mundo. Las gramíneas necesitan fertilizantes nitrogenados y condiciones adecuadas de humedad para crecer bien. Sin embargo, las leguminosas son más resistentes a la sequía y pueden agregar 200kg de nitrógeno/año/hectárea al suelo porque conviven asociados con bacteria que pueden convertir nitrógeno del aire a fertilizante nitrogenado. El valor nutritivo de forrajes es altamente influido por la etapa de crecimiento cuando son cosechados o pastoreados. ⁽³²⁾

El crecimiento puede ser dividido en tres etapas sucesivas:

- Etapa vegetativa.
- Etapa de floración.
- Etapa de formación de semillas.

Usualmente, el valor nutritivo de un forraje es más alto durante el crecimiento vegetativo y más bajo en la etapa de formación de semillas. Con el avance de madurez, la concentración de proteína, energía, calcio, fósforo y materia seca

digestible en la planta se reducen mientras la concentración de fibra aumenta. Mientras aumenta la fibra, aumenta el contenido de lignina, así haciendo los carbohidratos menos disponibles a los microbios del rumen. Como resultado, el valor energético del forraje se reduce. ⁽³²⁾

Así, cuando los forrajes son producidos con el propósito de alimentar ganado, deben ser cosechados o pastoreados en una etapa joven. El maíz y el sorgo, cosechados para ensilaje son dos excepciones, porque a pesar que el valor nutritivo de las partes vegetativas de la planta (tallo y hojas), en la formación de semillas una cantidad alta de almidón digestible se acumula en los granos. ⁽³²⁾

El rendimiento máximo de materia seca digestible de una cosecha forrajera se obtiene:

- En la etapa de la primera parte de madurez en el caso de gramíneas.
- En la etapa de medio a madura botón para leguminosas.

Hay poco que se puede hacer para prevenir la pérdida de valor nutritivo de un forraje con el avance de su madurez. Por cada día de atraso de la cosecha después del momento óptimo de madurez, la producción lechera potencial de las vacas que come el forraje será mermada. ⁽³²⁾

Las Gramíneas contienen ácidos fenólicos, y la mayoría flavonas, pero sólo los sorgos contienen taninos condensados. Su principal efecto sobre el valor nutritivo es reducir la utilización digestiva de los aminoácidos. Numerosos estudios han confirmado el efecto negativo de los taninos en las dietas para animales, ya que estos forman complejos insolubles con las proteínas y otras macromoléculas, afectando negativamente la energía metabolizable y la disponibilidad de proteína.

Este complejo tanino - proteína es considerado responsable del bajo nivel de crecimiento, baja digestibilidad de proteína y disminución de aminoácidos aprovechados e incremento de nitrógeno excretado. Por lo tanto, los taninos son parcialmente absorbidos en la pared intestinal y parecen requerir un suplemento de metionina para ser metabolizados y excretados en la orina. Además, las enzimas digestivas como la amilasa, lipasa y tripsina son fuertemente inhibidas, afectando en esta forma la digestibilidad de proteínas, grasas y almidones.

Las leguminosas forrajeras en general poseen altos contenidos de proteína pero no se usan mucho en la alimentación de bovinos por su poca resistencia al pastoreo y la dificultad para su cosecha mecanizada y además, problemas relacionados con el patrón de fermentación al ensilarlos, por esta razón se mezclan con especies forrajeras como las gramíneas por ser más favorables para elaborar ensilados e incrementar el contenido proteico del alimento. ⁽⁵⁷⁾

La utilización de leguminosa merece una mejor atención, principalmente en países tropicales donde la proteína es un factor limitante a la producción bovina. Estudios han demostrado que al asociar gramíneas con leguminosas en pastoreo; la producción láctea puede ser aumentada entre 17 y 65 % más que con la gramínea sola. ⁽⁶⁾

3.7 NUTRIENTES IMPORTANTES EN LA ALIMENTACIÓN DE GANADO VACUNO

El objetivo de muchos ganaderos alrededor del mundo es producir un volumen de leche con una composición adecuada; a la vez contar con vacas sanas y con un uso eficiente de los alimentos. Esta es la base de la producción eficiente de leche. Las raciones bien balanceadas van de la mano de una óptima producción

de leche. Esto varía de un ganadero a otro, dependiendo de las condiciones específicas que cada ganadero enfrenta: el precio de la leche, las posibilidades de pastoreo, el costo de los ingredientes de la ración, y la posibilidad de suministrar alimentos de producción propia son sólo algunas de estas condiciones. ⁽¹⁶⁾

Entre algunos nutrientes que deben ser considerados dentro del balanceo de las raciones se tienen:

- Proteína

Estas son parte de los tejidos del cuerpo y de los productos animales; y proveen los aminoácidos requeridos para el mantenimiento de las funciones vitales, como: reproducción, crecimiento y lactancia. ⁽⁶⁾

- Minerales

Una adecuada proporción de minerales en la dieta es esencial para una salud y altos niveles de producción de leche. La falta de atención con el contenido de minerales en la dieta frecuentemente conlleva a problemas reproductivos, tanto déficit como exceso de estos mismos. ⁽¹⁵⁾

- Fibra

Uno de los componentes principales de la dieta de la vaca lechera es la fibra. Los requerimientos de la misma para el ganado se expresa en Fibra Neutro Detergente (FND)⁽⁵⁹⁾ que representa la pared celular de los vegetales que constituye su elemento estructural o de sostén y está integrada por celulosa, hemicelulosa, lignina y además una serie de compuestos menores ligados a ella, también indigestibles (Sílice, Cutina), el análisis de FND es necesario para la formulación de raciones. ⁽³²⁾

3.8 GENERALIDADES BOTANICAS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

Frijol Espada (*Canavalia ensiformis*)

Generalidades

Este cultivo figura entre las leguminosas más promisorias actualmente estudiadas, cuyo empleo como abono verde y cultivo de cobertura se fomenta en las zonas tropicales húmedas. Su forraje se utiliza para pastorear bovinos y ovinos y su grano se utiliza para la alimentación de no-rumiantes y rumiantes, en estos últimos sin ningún tratamiento, en tanto que se requiere de procesos físicos, químicos o ambos, cuando se alimenta a no-rumiantes, a fin de eliminar sus factores anti nutricionales ⁽⁵³⁾.



Figura N° 3. *Canavalia ensiformis*

Origen y Distribución

La Canavalia es una planta nativa de América, reportándose su uso en las Indias Occidentales, Panamá, Guyana, Brasil y Perú. Es una planta cultivada en los trópicos y con alguna importancia en la India, Taiwán, Kenia y Hawaii; así como en el este de África ⁽⁵³⁾.

Clasificación

Reino: Vegetal;

División: Traqueófitas;

Clase: Angiospermeae;

Sub-clase: Dicotiledoneae;

Familia: Leguminoseae;

Género: Canavalia;

Especie: ensiformis Figura N° 4. Planta entera de ***Canavalia ensiformis***



Descripción morfológica:

La Canavalia es una leguminosa rústica, anual o bianual, de porte erecto; su crecimiento inicial es relativamente rápido, con hábito de crecimiento indeterminado que alcanza de 0.6 a 1.2 metros de altura; con formación de guías. Las hojas son alternas y trifoliadas, de color verde oscuro y brillante, con nervaduras bien sobresalientes. Presenta inflorescencias axilares en racimos, con flores grandes, corola de color violácea o roja. La vaina es larga, plana, dura, pudiendo alcanzar hasta 35 centímetros de largo y 3 centímetros de ancho, cada vaina contiene de 4 a 20 semillas grandes, redondeadas u ovaladas, de color blanco. ⁽⁵³⁾

Frijol Vigna (***Vigna sinensis***)

GENERALIDADES

El frijol Mono (***Vigna sinensis***) es una leguminosa de origen tropical que forma parte de los hábitos alimenticios de muchas regiones latinoamericanas, donde se consume básicamente en forma de grano integral. Resistente a la sombra, se planta en parcelas compartidas con gramíneas, como el maíz (***Zeamays***) o el sorgo (***Sorghum vulgare***), u otros cultivos como el algodón (***Gossypium spp.***) y la caña de azúcar (***Saccharum officinarum***). Como cultivo de rotación

tiene la ventaja de ayudar a fijar el nitrógeno al suelo, mejorando su rendimiento⁽⁴⁷⁾.



Figura N° 5. *Vigna sinensis*

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Especie de género *Vigna sinensis* proviene de la familia Fabaceae, su forma de vida es terrestre y su ciclo de vida puede ser anual y bianual además su crecimiento es diverso. Se cultiva además como forraje. Es un cultivo alimentario sumamente importante en los trópicos asiáticos y africanos ^{(12), (13)}.

CLASIFICACIÓN

Reino: Plantae,

División: Magnoliophyta,

Clase: Magnoliopsida,

Sub clase: Rosidae,

Familia: Fabaceae,

Género: Vigna;

Especie: sinensis ⁽⁴⁷⁾.

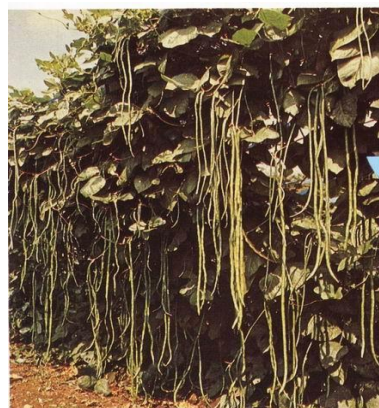


Figura N° 6. Planta entera de *Vigna sinensis*

DESCRIPCION MORFOLOGICA

Es una planta herbácea o semiarbusiva, trepadora de tallos ramificados y hojas trifoliadas levemente pubescentes. Flores amarillas, violeta claro o blancas. Fruto en legumbre lineal y cilíndrica con aproximadamente 7cm - 12 semillas. Las hojas son desiguales, cuyo fruto — una legumbre — se emplea como alimento en regiones tropicales del Viejo y Nuevo Mundo; se cultiva además como forraje ya que tolera bien la sequía y el calor, a diferencia de otras leguminosas⁽²⁵⁾.

REQUERIMIENTO DE CLIMA Y SUELO

Existen numerosas variedades cultivadas de muy diverso fotoperiodo, pero todas requieren una temporada cálida para la germinación y buen drenaje. Toleran suelos pobres en nutrientes y elevadas condiciones de acidez, así como regímenes de lluvias inferiores a los 300 mm anuales. Si se siembra en tiempo frío la germinación se retrasa, el desarrollo de la planta es escaso y las hojas se arrugan y toman una coloración purpúrea, las temperaturas elevadas no suelen perjudicar el cultivo solamente en el caso de calores muy fuertes en la época de floración y fructificación pueden producirse daños en el rendimiento y en la calidad. ⁽²⁵⁾

Sorgo (*Sorghum bicolor*)

GENERALIDADES

Se puede utilizar para la alimentación animal, principalmente como componente de mezclas y concentrados. También es usado como forrajes en la preparación de ensilajes y en pastoreo ⁽¹⁰⁾.

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Se estima que el sorgo o maicillo es originario de África Oriental, probablemente Sudán o Etiopía de donde se cree fue llevado por los nativos migratorios hacia otros países del continente. En El Salvador se le encuentra en zonas costeras, valles intermedios y últimamente se ha sembrado en la zona nororiental, dada su capacidad de resistir sequías prolongadas. ⁽¹⁰⁾

CLASIFICACIÓN

Clasificación Botánica:

Reino: Vegetal;

División: Traqueófitas;

Clase: Angiospermeae;

Sub clase: Monocotiledoneae:

Familia: Gramineae;

Género: Sorghum;

Especie: bicolor ⁽¹¹⁾



Figura N°7 *Sorghum bicolor*

DESCRIPCION MORFOLOGICA:

Su raíz es fibrosa o rizoma, posee raíces laterales grandes (profundidad radicular 1.20 metros); su tallo es herbáceo, cilíndrico y nudosos, con 8 a 10 yemas basales que se convierten en nuevos tallos, pueden llegar a tener un grosor de 5cms, su altura va desde 0.40 a 3.0 mts o más. Sus hojas son sencillas, envainadoras, ensiformes, dísticas, alternas, situadas a dos filas puestas, con légula entre la vaina y el limbo. Las panojas pueden ser compactas, difusas o intermedias, según el largo de los entrenudos ⁽⁵⁸⁾.

Rastreado: esta actividad permitirá dejar el suelo suelto para favorecer la germinación de la semilla y la emergencia de la plántula. Dependiendo del estado del terreno, se darán de 2 a 3 pasos de rastra.

Surcado: debe tener una profundidad de 10 a 15 cm para la germinación de la semilla y favorecer el drenaje. Se recomienda realizar un pasado de arado (cada 2 ó 3 años) para evitar la compactación del suelo. En terrenos con pendientes mayores al 15% se debe implementar la labranza mínima o cero labranza, la cama de siembra debe estar libre de malezas lo cual puede hacerse con productos químicos o manualmente.

Aporco: Debe realizarse de los 22 a 30 días después de la siembra; inmediatamente después de la segunda fertilización. Esta práctica se realiza con el objetivo de incorporar el fertilizante, controlar las malezas, ayudar a la fijación de la planta y favorecer el drenaje del suelo ⁽²¹⁾.

ALGUNAS VARIEDADES DE SORGO EN EL SALVADOR

Sorgo variedad CENTA S-2

Entre sus ventajas podemos mencionar, produce forraje y grano de alta calidad y posee gran potencial de rendimiento. Para forraje puede sembrarse en los meses de mayo, agosto o en la estación seca con humedad o regadío. Esta variedad fue introducida por el programa LASIP/CIMMYT, a través de los ensayos de la Comisión Latinoamericana de Investigadores de Sorgo (CLAIS).

⁽⁴⁶⁾(Ver Anexo N°1)



Figura N° 8. *Sorghum bicolor* variedad CENTA S-2

Sorgo variedad RCV

Es un sorgo que se puede sembrar entre las latitudes desde los 0 – 1300 msnm, en suelos planos y en alturas después de los 1300 msnm, su producción de panoja es baja y se tiene un bajo rendimiento del cultivo, su régimen de lluvia para una buena producción es de 500mm. Entre sus ventajas se puede mencionar que un cultivo de multi - rebrote, que su semilla es reutilizable y su ciclo de vida comprende de mayo a agosto. ⁽⁴⁶⁾(Ver Anexo N°1)



Figura N 9. *Sorghum bicolor* variedad CENTA RCV

CAPITULO IV

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

- Retrospectivo:

Esta investigación partió de una problemática la cuál fue la presentada por la Asociación Cooperativa Astoria, que se basó en que se están utilizando mezclas de forrajes a base de gramíneas y leguminosas sin saber el efecto que estas pueden tener dentro de la producción animal por la posible presencia de poseer taninos, por otro lado no se conoce que mezcla ensilada puede ser la más factible para su fermentación o ensilaje ya que se desconoce el efecto que tienen las leguminosas de ser difíciles de ensilarse por su alto contenido de nitrógeno y bajo contenido de carbohidratos.

- Bibliográfico:

Para poder dar respuesta a la problemática que tiene la Asociación Cooperativa Astoria con respecto al efecto negativo que pueden presentar los taninos en la alimentación a partir de una fuente forrajera a base de gramíneas (sorgo) mezclado en diferentes proporciones con leguminosas (Frijol Espada/Canavalia y Frijol Mono) se recolectó toda la información relacionada a este tema que nos conllevara a encontrar una solución o recomendación viable a esta cooperativa.

- Experimental:

Por otra parte, se realizó la cuantificación de taninos totales y taninos condensados en las mezclas de forrajes a base de una gramínea Sorgo (*Sorghum bicolor*) y dos leguminosas, El frijol Espada/Canavalia (*Canavalia ensiformis*) y el frijol Mono (*Vigna sinensis*), por dos métodos espectrofotométricos (método de folin ciocalteu y método de proantocianidinas HCl-Butanol), esto se llevó a cabo en el Laboratorio del Departamento de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas y en el Laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia, ambos laboratorios ubicados en la

Universidad de El Salvador, después de realizada la cuantificación de taninos se procedió a analizar la ración más viable para alimentar al ganado sin que se viera disminuida la producción de leche como la reproducción del animal, por otro lado estos datos sirvieron de base para futuras investigaciones con las cuales se puede mejorar la ganadería de El Salvador a través de la utilización de materiales alternativos y locales para la alimentación del ganado.

4.2 Investigación bibliográfica

Se realizara en:

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.
- Internet.

4.3 Investigación experimental

Se realizará en dos etapas:

- ETAPA 1. Recolección de las mezclas de forrajes a base de una gramínea: Sorgo (*Sorghum bicolor*) y dos leguminosas: El frijol espada/Canavalia (*Canavalia ensiformis*) y el frijol Mono (*Vigna sinensis*), teniendo como patrón los ensilajes previamente elaborados en la Asociación Cooperativa Astoria ubicada en el municipio de San Pedro Masahuat en el departamento de La Paz en el lote el Volador Oriente, en las coordenadas geodésicas N 13°25'45.7"; WO 89°02'47.3" a 21 metros sobre el nivel del mar teniendo una pendiente aproximada de 5 % (Ver Anexo No. 2), y luego serán conducidas a los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agronómicas.

- ETAPA 2: Se llevó a cabo la determinación de la calidad nutricional de los forrajes a través del análisis bromatológico proximal, método de Wendee: % de humedad, % de proteína cruda, % de fibra cruda, % de extracto etéreo, % de materia seca, % de cenizas y el % de extracto libre de nitrógeno y el método de Van Soest; % de fibra neutro detergente, % de fibra ácido detergente, luego se prepararon extractos con acetona al 70% para la Cuantificación de taninos por dos métodos: Folin Ciocalteu y Proantocianidinas, que se realizaron en el Laboratorio del Departamento de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas y en el Laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia, ambos de la Universidad de El Salvador.

Universo

- Mezclas de forrajes a base de una gramínea: Sorgo (***Sorghum bicolor***) y dos leguminosas: El frijol espada/Canavalia (***Canavalia ensiformis***) y el frijol Mono (***Vigna sinensis***).

Muestra

- Las muestras en estudio corresponden a ensilados (microsilos) que fueron elaborados a partir de diferentes mezclas de forrajes a base de una gramínea: Sorgo (***Sorghum bicolor***) en sus variedades CENTA S-2 y CENTA RCV y dos leguminosas: Frijol Espada/Canavalia (***Canavalia ensiformis***) y Frijol Mono (***Vigna sinensis***) en las siguientes proporciones:(80:20), (70:30), (60:40) y (50:50), esto se detalla en la tabla N°1 que se presenta a continuación:

Tabla N°1. Mezclas y proporciones de los que está constituido cada uno de los forrajes que serán utilizados para alimento de ganado vacuno.

Mezcla Variedad forrajera (Gramínea – Leguminosa)	Proporción
S-2 + C	50:50
	60:40
	70:30
	80:20
S-2 + V	50:50
	60:40
	70:30
	80:20
RCV+C	50:50
	60:40
	70:30
	80:20
RCV+V	50:50
	60:40
	70:30
	80:20

Abreviaturas: S-2 + C (Sorgo S-2 + **Canavalia ensiformis**), S-2 + V (Sorgo S-2 + **Vigna sinensis**), RCV + C (Sorgo RCV + **Canavalia ensiformis**) y RCV + V (Sorgo RCV + **Vigna sinensis**)

4.4 Preparación de la muestra

- Después del proceso de fermentación y estabilización (25 días) de los microsilos a base de una gramínea: Sorgo (**Sorghum bicolor**) en sus variedades: CENTA S-2 y CENTA RCV y dos leguminosas: Frijol Espada/ Canavalia (**Canavalia ensiformis**) y Frijol Mono (**Vigna sinensis**) en sus diferentes proporciones (80:20), (70:30), (60:40) y (50:50), se procedió a abrir cada microsilo, se tomó una muestra representativa y se condujeron dichas

muestras al laboratorio del Departamento de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas para realizar un proceso de deshidratación Humedad Parcial (% HP) a una temperatura inferior a 30 - 50°C, luego un proceso de molido, en un molino adecuado para obtener muestras homogéneas y con tamaño de partícula uniforme pasadas por un tamiz de 0.25 mm, y así acondicionarlas para la realización de los análisis.

4.5 Preparación del extracto de taninos. ⁽³³⁾

Después de obtener las muestras deshidratadas y molidas, se procedió a la extracción con acetona al 70% siguiendo la metodología detallada a continuación:

- Pesar 200 mg de muestra de forraje y colocar en un vaso de precipitado de 30mL de capacidad.
- Adicionar 10 mL de acetona al 70% al vaso de precipitado con muestra de forraje y suspender en un baño de agua por ultrasonidos Branson 3210 durante 10 minutos, dejar en reposo por 5 minutos y repetir el procedimiento una vez más a temperatura ambiente.
- Transferir el contenido del vaso, a tubos de centrifugación y someter a centrifugación durante diez minutos aproximadamente a 3000 RPM a 4°C (si la centrífuga refrigerada no hubiera estado disponible, se iba a enfriar el contenido en hielo y centrifugar a 3000 RPM usando la centrífuga convencional).
- Recolectar el sobrenadante en el vaso de precipitado y repetir este procedimiento descrito anteriormente una vez más.

4.6 Métodos de Cuantificación de taninos

La cuantificación de taninos en cada una de las muestras de forrajes se realizó por dos métodos: a) Método de Folin-Ciocalteu y b) Método de Proantocianidinas (HCl – Butanol).

a) Método de Folin – Ciocalteu ⁽³³⁾

Fundamento: El método de Folin Ciocalteu se basa en la oxidación de los fenoles, en medio básico, mediante el reactivo de Folin Ciocalteu (mezcla de complejos de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico), produciéndose, por reducción del reactivo, una mezcla de complejos de wolframio y molibdeno que presenta una coloración azul característica que es detectada espectrofotométricamente. ⁽⁴⁾

El reactivo de Folin Ciocalteu es una solución ácida de polímeros complejos de los ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico. Este reactivo, de color amarillo, oxida los fenolatos, reduciéndose los ácidos del reactivo, para dar lugar a un complejo azul de molibdeno-wolframio.

En este proceso se produce una reducción parcial del estado de valencia de Molibdeno y Wolframio de +6 a +5 por los fenoles en un álcali acuoso y el resultado será expresado en equivalentes de ácido tánico. Este método determina la totalidad de grupos fenólicos libres y por consiguiente determina la totalidad de fenoles solubles como taninos hidrolizados y taninos condensados. Una reducción completa, a la valencia más baja, destruye el color. La naturaleza de estos complejos no se conoce bien.

Este método no discrimina entre taninos y compuestos fenólicos diferentes a los taninos y/o entre estos y otros materiales fácilmente oxidados. Compuestos de

interferencia tales como ácido ascórbico, tirosina y posiblemente la glucosa son también medidos. ⁽¹⁴⁾

Los fenoles sólo son oxidados rápidamente en un medio suficientemente alcalino. Pero, en estas condiciones, el reactivo oxidante y el pigmento azul son inestables. Por ello, el reactivo deberá encontrarse en exceso, para que, aún a pH alcalino, se conserve al menos una fracción inalterada durante el tiempo necesario para reaccionar con todos los fenoles. ⁽¹⁴⁾

Análisis para cuantificación de fenoles totales ⁽³³⁾

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

- Preparar el extracto de taninos a partir de las muestras de forraje
- Tomar una alícuota apropiada del extracto en los tubos de ensayo, llevar a un volumen de 2.5 mL con agua destilada, adicionar 0.25 mL de reactivo de Folin Ciocalteu y luego 1.25 mL de solución de carbonato de sodio.
- Agitar los tubos y leer la absorbancia a una longitud de onda de 725 nm después de 40 minutos en reposo.
- Calcular la cantidad de taninos totales como equivalente de ácido tánico comparándolos con los valores obtenidos en la curva de calibración estándar de Acido tánico (Ver anexo N°8).El contenido de taninos se expresa en base seca (MS%).

Separación de taninos del extracto. ⁽³³⁾

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

- Pesar 100 mg de PVPP (Polivinilpirrolidona) en un tubo de ensayo de 100 x 12 mm.

- Adicionar 1.0 mL de agua destilada y luego 1.0 mL de extracto que contiene taninos (100 mg de PVPP son suficientes para unir 2 mg de taninos totales; si el contenido total de taninos en la muestra es mayor que el 10% con respecto a la materia seca, será apropiado diluir el extracto).
- Agitar cuidadosamente en forma circular los tubos de ensayo.
- Mantener los tubos a temperatura de 4°C por 15 minutos y agitarlos nuevamente en forma circular, luego centrifugar los tubos a 3000 RPM por 10 minutos.
- Recolectar el sobrenadante. (Este sobrenadante solo tiene fenoles simples que no son taninos; los taninos han sido precipitados junto con el PVPP) y medir el contenido fenólico (tomar por lo menos el doble de volumen usado para la estimación de fenoles totales, porque el extracto ha sido diluido dos veces y se espera perder los fenoles-taninos a pesar de haber sido arrastrados con PVPP).
- Expresar el contenido de fenoles simples (no taninos) sobre la base seca (Y%).

b) Método de Proantocianidinas (HCl – Butanol) ^{(14), (33), (48)}

Este método se fundamenta en una reacción tipo endo, específico para taninos condensados (proantocianidinas); el método implica la despolimerización de los taninos condensados por catalización ácida en butanol para obtener antocianidinas de color rojo procedentes de la ruptura oxidativa de los enlaces interflavánicos de las proantocianidinas poliméricas y ser detectadas espectrofotométricamente.

La limitante del método radica en que los polímeros de taninos son separados en dímeros o trímeros, en lugar de monómeros; es decir, los flavan-oles monoméricos no son detectados en las citadas condiciones de reacción apropiadas para polímeros, por lo que los resultados de taninos condensados

pueden ser subestimados; además exige el empleo de estándares específicos para cada tipo de taninos.

El método de HCl - Butanol es también usado para estimar la cantidad de taninos insolubles de residuos de extracción o de Fibra Neutro Detergente (FND). Como principal problema que se presenta no todos los pigmentos rojos se disuelven resultando en una subestimación de los taninos.

El grado de polimerización de los taninos condensados puede ser estimado mediante la combinación del método de HCl - Butanol con el de vainillina. El método de HCl - Butanol mide la totalidad del número de flavonoides presentes del polímero lo que da lugar a la producción de antocianinas y el método de vainillina mide el número de moléculas.

Si el extracto de flavan-4-oles, desarrolla un color rosa en frío, usar un blanco en caliente para cada muestra que comprenda 0,5 ml del extracto, 3 ml de butanol y 0,1 ml del reactivo férrico. Taninos condensados como equivalente de leucocianidina se calcula mediante la fórmula:

$$(\text{Absorbancia de la muestra a } 550 \text{ nm} \times 78.26 \times \text{FD}) (\% \text{MS})$$

Esta fórmula asume que el coeficiente de extinción molar ($E^{1\%,1 \text{ cm}, 550 \text{ nm}}$) de leucocianidinas es 460.

Nota: el factor de dilución es igual a 1 si no se adiciona acetona al 70% al extracto que se elaboró con 200 mg de muestra en 10 mL de solvente. Pero cuando se adiciona acetona al 70% el factor de dilución es: 0.5 mL/volumen de extracto tomado, esto con el fin de que la absorbancia no exceda el 0.6.

Notas: La presencia de pigmentos puede interferir en el método. Los pigmentos pueden ser removidos por extracción de hojas secas con éter de petróleo conteniendo ácido acético al 1%.

El método Vainillina – Metanol es también utilizado para la cuantificación de taninos condensados, pero este no es específico. Este método mide taninos condensados como simples flavonoides.

Podría adicionarse ácido ascórbico al momento de la adición de los reactivos para prevenir la oxidación de fenoles no interfiere en el ensayo.

Análisis para la determinación de Taninos Condensados

Método de Proantocianidinas (HCl - Butanol)

Procedimiento (Ver Anexo N° 6)

- Pipetear 0.5 mL de extracto de taninos previamente diluido con acetona al 70% en un tubo de ensayo de 100 x 12 mm (La cantidad de acetona debe ser lo suficientemente grande para evitar que la absorbancia sea mayor de 0.6 esto dependerá de la cantidad de taninos condensados en la muestra, y ocasionalmente necesitara ser determinado por medio de prueba y error).
- Adicionar a los tubos 3 mL de reactivo HCL - Butanol y 0.1 mL de reactivo férrico.
- Agitar los tubos.
- Cubrir la boca del tubo con un tapón de vidrio y colocarlos en un baño maría a 97-100 °C por 60 min.
- Enfriar los tubos y registrar las absorbancia a una longitud de onda de 550 nm; restar un blanco adecuado, (que suele ser la absorbancia de la mezcla sin calentar).

4.7 Análisis Bromatológico Proximal ^{(29), (31)}

Es una disciplina científica que estudia íntegramente a los alimentos. Con este análisis se pretende conocer las composiciones químicas, físicas y microbiológicas (microorganismos y toxinas), hacer el cálculo de las dietas en las diferentes especies y ayudar a la conservación y el tratamiento de los alimentos. ⁽¹⁷⁾

El estudio bromatológico incluye las siguientes técnicas de análisis:

- Análisis microbiológico
- Análisis toxicológico
- Análisis químico (WENDEE Y VAN SÖEST)
- Evaluación organoléptica

TECNICAS DE ANALISIS BROMATOLOGICO DE ALIMENTOS ⁽¹⁾

a) WENDEE (Ver Anexo N° 3) El sistema proximal, también llamado Weende de Análisis Proximal, ha sido usado generalmente para la investigación nutricional de todos los alimentos. Este análisis fracciona los alimentos en seis componentes, cada uno de ellos agrupa varios nutrientes que tienen propiedades comunes. Estos análisis son:

- Humedad (Humedad parcial y Humedad total)
- Proteína Cruda
- Extracto Etéreo
- Fibra Cruda
- Extracto Libre de Nitrógeno (Carbohidratos)
- Cenizas

b) VAN SÖEST (Ver Anexo N° 3) Permite la separación de los carbohidratos en fracciones relacionadas con su disponibilidad nutrimental (muy disponibles, poco disponibles y nada disponibles). Estos análisis son:

- Fibra Neutra Detergente (FND)
- Fibra Acido Detergente (FAD) ⁽¹⁾

METODO DE WENDEE

a) Humedad ⁽²⁹⁾

La determinación de humedad es una separación por volatilización que se fundamenta en una modificación del estado físico, que da lugar a la formación de un gas o vapor. El método se puede aplicar sencillamente a la expulsión de un material volátil “que no se recoge” para obtener el constituyente (s) buscado (s) como residuo, sólido o líquido.

En otros casos la determinación de humedad implica recoger el material volátil por absorción del gas o vapor en un absorbente adecuado, o la condensación del vapor al estado líquido o sólido. Ejemplo: la volatilización del amoníaco cuando se está en la etapa de destilación en la determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl.

Las determinaciones o análisis basados en los métodos de volatilización pueden ser de dos tipos:

1. **MÉTODOS DIRECTOS:** En estos métodos se recogen los componentes volátiles para efectuar en ellos las medidas correspondientes. Ejemplo: determinación de Carbono e Hidrogeno en compuestos orgánicos, los que se recogen sobre absorbentes adecuados a Dióxido de Carbono y Agua formados, durante la combustión.

2. MÉTODOS INDIRECTOS: En estos métodos se mide la pérdida de peso. El constituyente o analito buscado, puede formar parte de la materia volátil determinada por diferencia de peso de la muestra antes y después del tratamiento.

- **Humedad Parcial (HP%).** ⁽²⁹⁾

El componente más abundante y el único que casi siempre está presente en los alimentos es el agua, es decir que es la sustancia más simple de los alimentos; tiene un papel muy importante en muchos procesos físicos y químicos de los cuales depende la vida. Tanto los tejidos vegetales como los de animales contienen agua en abundancia.

Algunos autores consideran que las hojas de la vegetales verdes contienen 90% o más de agua, y una carne sometida a cocimiento durante el cual se pierde cantidad de agua; contiene entre 50 y 65%. Esta agua puede encontrarse en los alimentos en varias formas “como agua esencial y agua no esencial”. Generalmente para realizar un análisis químico cuantitativo es necesario eliminar esas clases de agua para poder reportar los resultados analíticos en “base seca”.

Se entiende por “humedad la cantidad de agua libre y combinada que contiene un alimento”. Aunque un alimento haya perdido todo su contenido de agua mediante un tratamiento térmico, al encontrarse de nuevo en un determinado ambiente y enfriarse vuelve a fijarse en él vapor de agua procedente de la atmósfera”. Este fenómeno se realiza hasta que el alimento se encuentre en equilibrio con la humedad ambiental. Por tanto, ningún alimento en forma natural o preparada para su análisis podrá estar totalmente libre de agua, es decir, con el 100% de humedad o materia seca.

Cuando se determina la humedad parcial en forrajes verdes, ensilados, tubérculos se utiliza una estufa de aire reforzado o ventilación forzada a una temperatura entre 70 y 80°C por un período de 24 horas, o una estufa corriente a 104°C durante 4 horas reduciéndose posteriormente la temperatura a 80°C durante 4 horas más.

Para la determinación de humedad o materia seca en alimentos se puede utilizar otras técnicas en el laboratorio como:

- Evaporación del agua en un liofilizador
- Deseccación rápida mediante acción de rayos infrarrojos
- Determinación del contenido de agua por conductividad eléctrica.

Pero de todos ellos el más sencillo y común corresponde al secado en estufa, Los ensilados pueden contener compuestos que se evaporen fácilmente con ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico y amoníaco). Algunos azúcares pueden descomponerse a temperatura > 70°C. Muchos terpenos se insolubilizan a temperatura > 70°C. Para evitar esto de acuerdo la naturaleza de la muestra se utiliza desecación al vacío, liofilización; secado en estufa a 60°C o el uso de la destilación con tolueno.

La determinación de humedad en el campo agropecuario y veterinario es de gran importancia; se utiliza en el análisis de concentrados, pastos, suelos, tejido vegetal, leche, productos biológicos, etc.; con el objeto de obtener información necesaria para lo siguiente:

- a) Determinar la materia seca de las muestras en base: “Tal como ofrecido”, este término se refiere al estado en que se encuentra el alimento cuando lo consume el animal.

“Tal como recolectado” se emplea para materiales que generalmente no se utilizan para la alimentación: orina, heces.

“Tal como recibida”: como fue recogida la muestra; fresca húmeda, seca y enviada al laboratorio.

- b) Preparar la muestra para realizar los análisis químicos.
- c) Reportar los resultados de los análisis químicos en “base seca” o como materia seca total, “que indica que la muestra está libre de humedad”.

La determinación de Humedad parcial se fundamenta en la pérdida de peso que sufre una muestra cuando se calienta a una temperatura entre 60 – 70°C por un período de veinticuatro horas, en un equipo conocido como estufa de aire reforzado o ventilación forzada. Luego se coloca en un desecador para llevar la muestra a equilibrio con la humedad ambiente y se pesa cuando se enfría.

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

- Pesar una bolsa de papel vacía de 4 – 5 libras de capacidad y anotar el peso.
- Lavar con agua destilada las muestras de forraje para eliminar el polvo que pueda contener y secar con papel toalla.
- Cortar el tejido vegetal separando tallo y hoja en tamaños de 5-6 cm, homogeneizar bien la muestra.
- Introducir las muestras después de lavarlas y cortarlas en una bolsa de papel de 4-5 libras y perforar las bolsas con el objeto de que circule aire durante el proceso de secado.
- Rotular las bolsas (con lápiz de grafito): Nombre del analista, fecha, identificación de muestra, peso de bolsa vacía, peso de bolsa más muestra antes de secar (para obtener el peso de muestra).

- Cerrar la bolsa y colocar en la estufa a durante 24 horas, previamente calentada a 70 °C.
- Sacar la muestra de la estufa, enfriar en desecador, pesar, anotar el peso de la bolsa más muestra después de secar. Se obtiene pérdida de peso.

Cálculo para porcentaje de Humedad parcial

$$(\text{Peso}_{\text{bolsa + muestra}}) - (\text{Peso}_{\text{bolsa vacía}}) = \text{Peso de muestra}$$

$$(\text{Peso}_{\text{bolsa+muestra antes de secar}}) - (\text{Peso}_{\text{bolsa+muestra después de secar}}) = \text{Pérdida de peso}$$

$$\% \text{ Humedad Parcial} = \frac{(\text{Pérdida de peso}) (100\%)}{\text{Peso de muestra}}$$

- **Humedad total (HT%)** ⁽²⁹⁾

La humedad total se determina en muestras como: Melaza, concentrados, harinas, de origen vegetal, tejidos vegetales, tejidos de animales, miel, etc. Esta técnica elimina el agua fuertemente enlazada a la muestra, y sirve el valor para reportar los datos del análisis en base seca.

La determinación de humedad total se fundamenta en que la cantidad de agua se elimina por calentamiento de la muestra en una estufa de vacío a temperatura de 105°C durante cinco horas y presión de 100 mm de Hg.

Procedimiento (Ver Anexo N°5)

- Calentar a 105°C en una estufa de vacío la caja de aluminio durante un período de 2 horas y enfriar en desecador por 30 minutos, pesar en balanza analítica (anotar el peso).
- Pesar ± 2.0 g de muestra previamente homogenizada en la misma caja (anotar el peso).

- Colocar destapada la caja de aluminio más muestra en la estufa de vacío, previamente calentada a 105°C, durante 5 horas. Ajustar bien la presión del vacío.
- Retirar la caja de la estufa, tapar y poner en desecador para enfriar durante 30 minutos (anotar el peso).

Cálculo para porcentaje de Humedad total:

$$(\text{Peso}_{\text{caja + muestra antes de secar}}) - (\text{Peso}_{\text{caja vacía}}) = \text{Peso de muestra}$$

$$(\text{Peso}_{\text{caja + muestra antes de secar}}) - (\text{Peso}_{\text{caja + muestra después de secar}}) = \text{Pérdida de peso}$$

$$\% \text{ Humedad total} = \frac{(\text{Pérdida de peso}) (100\%)}{\text{Peso de muestra}}$$

b) Proteína Cruda (PC%) ⁽²⁹⁾

El método de valoración de Nitrógeno proteico de mayor aplicación universal para alimentos es el ideado por kjeldahl en 1883. En este método se mide la cantidad de nitrógeno que contiene una muestra y se convierte el nitrógeno en proteína multiplicándolo por un factor de acuerdo a la naturaleza de la proteína, ya sea de origen animal o vegetal.

En la determinación química de las proteínas, los datos son expresados como Nitrógeno proteico total. El valor del nitrógeno varía según su composición y está vinculado a su origen, es distinto en general para los vegetales y presenta también diferencias dentro de cada tipo, estableciéndose de acuerdo al contenido de nitrógeno de cada proteína, los factores de conversión del dato de nitrógeno en la proteína correspondiente.

Para las proteínas animales cuyo contenido de Nitrógeno es 16, se aplica el factor 6.25, con caso particular para la caseína de la leche, que contiene 15.5 átomos de Nitrógeno se aplica el factor 6.38. Por este método se puede determinar todo tipo de nitrógeno presente en la muestra, como amoniacal, ureico, nítrico, nitratos con solo cambiar los reactivos catalizadores.

El método consiste en determinar el nitrógeno proteico mediante cuatro pasos:

- Digestión: consiste en quemar o destruir toda la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado y caliente (actúa sobre la materia orgánica deshidratándola y carbonizándola) en presencia de catalizadores que aceleran el proceso (aumentando el punto de ebullición del ácido), oxidando el grupo carbonilo y reduciendo el nitrógeno a amoníaco que queda fijado al ácido sulfúrico en forma de sulfato de amonio, estable en las condiciones de trabajo.
- Destilación: consiste en el desprendimiento del amoníaco por efecto de un álcali fuerte (NaOH al 40%) en corriente de vapor de agua.
- Fijación: el amoníaco que se desprende se fija en un volumen conocido de una solución de ácido bórico al 4% e indicador, formándose borato de amonio.
- Titulación: el borato de amonio se titula con HCl (o H_2SO_4).

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

Digestión

- Pesar en papel filtro ± 0.1 g de muestra y colocarla en un tubo Tecator para micro Kjeldahl de 250 mL; si la muestra es líquida, medir con pipeta volumétrica 1.0 mL.

- Agregar al tubo, que contiene la muestra pesada o medida exactamente; 6.0 mL de ácido sulfúrico concentrado y 3 g de la mezcla de catalizador. Nota: Preparar un blanco que contenga 6.0 mL de ácido sulfúrico concentrado y 3.0 g de mezcla de catalizador, que sea tratado de igual manera que el tubo que contiene la muestra y será conocido como testigo.
- Agitar durante 5 minutos y colocar el tubo en el aparato de digestión Kjeldhal; al mismo tiempo, conectar el sistema de extracción de vapores y condensación de gases. Mover constantemente (por medio de rotación) los tubos y esperar hasta que la solución sea transparente o de color azul o verde (según el catalizador utilizado).

Destilación

- Enfriar los tubos, agregándoles \pm 80 mL de agua destilada, esperar que enfríen. Agregar 10 mL de solución de NaOH al 40%.
- Colocar en un erlenmeyer de 250 mL, 25.0 mL de la solución de ácido bórico al 4% más 3-5 gotas de solución indicadora de verde de bromocresol y rojo de metilo, y colocarlo en el equipo de destilación para determinación de proteína cruda (solución de color rojo).
- Recibir el destilado en el erlenmeyer de 250 mL, el que debe estar en el aparato después de 5 minutos de trabajo del mismo (hasta que se detiene el equipo de destilación) que se verá un cambio del indicador de rojo a verde. Deje enfriar el destilado por 20 a 30 minutos.

Titulación

- Después de dejar enfriar el destilado, titular con solución de ácido clorhídrico 0.1 N (o ácido sulfúrico 0.025N) hasta cambio de color del indicador que va de verde a rojo.

Cálculo

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{mL HCl}_{\text{muestra}} - \text{mL HCl}_{\text{testigo}}) (\text{N HCl}) (\text{meq. de N}) (100\%)}{\text{Peso de muestra (mg)}}$$

$$\% \text{ Proteína Cruda} = (\% \text{ Nitrógeno}) (6.25)$$

Dónde:

N_{HCl} = Normalidad del ácido clorhídrico

meq. de N = miliequivalentes de Nitrógeno = 0.014008 meq

6.25 = Factor Internacional de conversión para proteína, este factor se aplica a la mayoría de proteínas animales y vegetales ya que se asume que en su composición poseen entre 16–19% de Nitrógeno. Cuando se trate de otro tipo de muestra, se debe buscar el factor correspondiente.

c) **Extracto Etéreo (EE%)** ⁽²⁹⁾

Esta determinación cumple un rol importante como medida de la proporción de grasa presente en una muestra, sin embargo según la naturaleza de la muestra no sólo grasa es la que se extrae mediante el solvente orgánico, pues en el caso de las muestras de origen vegetal algunas vitaminas liposolubles y colorantes también son disueltas y cuantificadas en el extracto etéreo.

Desde un punto de vista nutricional la determinación de extracto etéreo sirve no sólo para identificar la grasa presente, sino también a partir de ésta, estimar el contenido calórico del material. El mantenimiento de una dieta bien balanceada que cumpla con los requerimientos nutricionales de un animal es imprescindible para un óptimo funcionamiento del organismo, incluyendo la función inmunológica, y la prevención de trastornos metabólicos.

El método de Soxhlet se ha constituido en un excelente procedimiento para esta determinación, su principio sencillo basado en gravimetría permite un análisis simple y de resultados confiables. El Soxhlet es un extractor intermitente, muy eficaz, pero tiene la dificultad de usar cantidades considerables de disolvente. El equipo de extracción consiste en tres partes: el refrigerante, el extractor propiamente dicho (que posee un sifón que se acciona automática e intermitente) y el recipiente colector donde se recibe o deposita la grasa.

El fundamento del método de extracto etéreo consiste en que al calentarse el sistema, el solvente que se encuentra en el recipiente colector se evapora, los vapores ascienden por el tubo lateral, se condensan en el refrigerante y caen sobre la muestra que se encuentra en la cámara de extracción en un dedal o paquetito. El disolvente se va acumulando hasta que su nivel sobrepase el tubo sifón, el cual se acciona y transfiere el solvente cargado de materia grasa al recipiente colector. Nuevamente el solvente vuelve a calentarse y evaporarse, ascendiendo por el tubo lateral quedando depositado el extracto etéreo en el recipiente colector.

El proceso se repite durante el tiempo que dure la extracción en forma automática e intermitente y así la muestra es sometida constantemente a la acción del solvente. Cuando el proceso se completa, el éter se destila y se recolecta en otro recipiente; la grasa cruda que queda en el recipiente colector se seca y se pesa.

Preparación de material de vidrio y dedales

- Lavar el material con agua jabonosa y volver a lavar con detergente adecuado (Ej. Rinso), enjuagar con abundante agua de chorro, luego con agua destilada y secar; enjuagar con 25 mL de éter y volver a secar en la estufa a 100 °C por 2 horas. Poner los frascos en desecador, enfriar y pesar (anotar el peso). Si se

utilizan dedales de Alundum, deben sumergirse en agua regia por algunas horas, después enjuagar con abundante agua destilada.

- Antes de comenzar este análisis, es recomendable lavarse las manos a fin de evitar que se contaminen con la grasa de las manos. No olvidar identificar bien los dedales y los frascos en los que recibirá la grasa.

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

- Pesar en papel filtro ± 2.0 g de muestra a la que se le ha determinado la humedad a 105 °C y colocarlos con un dedal de extracción limpio y seco. Anotar el peso como "peso seco".
- Cubrir la muestra con un papel filtro de casi igual diámetro al interior del dedal o ponerle algodón. Esto permite que el éter se distribuya en forma uniforme.
- Colocar el dedal con la muestra en el recipiente para muestras y fijarlo bajo el condensador del aparato de extracción Soxhlet.
- Agregar 150 mL de éter al balón y colocarlo sobre el condensador.
- Abrir la llave del agua que enfría el condensador, subir las placas de la cocina hasta que se pongan en contacto con los beakers y encender los calentadores.
- Observar si hay escapes de éter después de que éste comienza a ebulir y condensarse. Cuando el nivel del éter en el balón baje a su nivel constante, debido a que en una porción siempre está volatilizándose y condensándose, el aparato puede dejarse solo y realizar observaciones periódicas. El periodo de extracción en el equipo de extracción Soxhlet es de 8 horas.
- Después de que la extracción se complete, bajar los calentadores y permitir que el dedal drene completamente.

- Remover las muestras y colocar en su lugar los tubos de vidrio para recoger el éter.
- Volver a colocar los balones y destilar el éter en los tubos colectores.
- Remover los balones poco antes de que el éter se evapore hasta sequedad,
- Vaciar el éter de los tubos recibidores en un recipiente especial para conservar el éter usado.
- Completar la evaporación del éter que queda en los balones, dejándole sobre la mesa de trabajo un rato.
- Secar los balones en una estufa a 100 °C, después enfriarlos en el desecador a temperatura ambiente del laboratorio y pesarlos (anotar el peso).

Nota: La muestra desengrasada que contiene el dedal de extracción se utiliza para el análisis de Fibra cruda.

Cálculo

$$\text{Peso de muestra} = (\text{Peso}_{\text{papel filtro + muestra}}) - (\text{Peso}_{\text{papel filtro vacío}})$$

$$\text{Peso de Extracto Etéreo} = (\text{Peso}_{\text{frasco + Extracto Etéreo}}) - (\text{Peso}_{\text{frasco vacío}})$$

$$\% \text{ Extracto Etéreo} = \frac{(\text{Peso de Extracto Etéreo}) (100\%)}{\text{Peso de muestra}}$$

d) Fibra Cruda (FC%) ⁽²⁹⁾

Para determinar fibra cruda se utiliza el residuo del extracto etéreo.

El análisis de fibra cruda se fundamenta en que al residuo de extracto etéreo se le hacen dos digestiones, la primera con ácido sulfúrico 1.25% (digestión ácida) y la segunda con hidróxido de sodio 1.25% (digestión básica), lavando el material después de cada digestión con suficiente agua destilada caliente hasta eliminación de ácido o álcali del material. La muestra se lava después con alcohol, se seca y calcina, calculándose el porcentaje de fibra obtenido después de la calcinación.

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

- Colocar la muestra desengrasada en un beaker de 600 mL que contenga 200 mL de solución ácido sulfúrico al 1.25%.
- Pesar en balanza analítica 0.5 g de fibra de asbesto preparada y agregar al beaker.
- Colocar el beaker en el aparato de digestión, dejar ebulir exactamente 30 minutos girando el beaker cada 5 minutos para evitar que las partículas sólidas se adhieran a las paredes del recipiente.
- Retirar el beaker del aparato de digestión al terminar los 30 minutos. Filtrar a través de la tela especial puesta en el embudo y recibir las aguas del lavado en un beaker limpio y lavar el residuo que queda sobre el filtro con agua destilada hirviendo, hasta que las aguas de lavado no den reacción ácida, lo que se comprueba con anaranjado de metilo.
- Agregar al beaker original 200 mL de solución de NaOH 1.25%, poner a hervir y cuando esté hirviendo agregar el residuo que está sobre el filtro.

- Hervir durante 30 minutos, lavar siempre con agua destilada hirviendo como en pasos anterior y comprobar ausencia de reacción alcalina con indicador fenolftaleína.
- Pasar el residuo cuantitativamente a un Crisol de Gooch que contenga una capa uniforme de asbesto, colocarlo en el frasco Kitasato. Agregar 15 mL de alcohol (etílico, metílico, propílico) y filtrar aplicando succión.
- Secar el Crisol de Gooch y su contenido en una estufa a una temperatura de 130 °C durante 2 horas, poner en un desecador y pesar. Calcinar a 600 °C en mufla durante 30 minutos, poner en desecador, enfriar y pesar. La pérdida de peso es considerada como Fibra Cruda.

Cálculos

$$\% \text{ Fibra Cruda} = \frac{(\text{Pérdida de peso después de calcinada a } 600 \text{ } ^\circ\text{C}) (100\%)}{\text{Peso de muestra usada en determinación de Extracto Etéreo}}$$

e) Cenizas (C%) ⁽²⁹⁾

La mayor parte de los alimentos del ganado han sido constituyentes de seres vivos y no contienen únicamente compuestos orgánicos, ya que en ellos existe una serie de elementos inorgánicos (metales y no metales). Algunos de estos elementos son indispensables para la vida, otros son tóxicos y también existen otros que se consideran indiferentes. En el caso particular de fósforo y azufre, éstos pueden encontrarse en forma orgánica e inorgánica.

La fracción inorgánica de los alimentos tiene un gran valor nutritivo, generalmente se le determina con el término “cenizas”. Las cenizas de los productos alimenticios están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha quemado.

Las cenizas obtenidas no tienen necesariamente la misma composición que la materia mineral presente en el alimento original ya que pueden haber existido pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes. En las cenizas aparecen todos los minerales menos yodo y selenio porque se volatilizan. El valor de las cenizas puede considerarse como una medida general de la calidad y a menudo es un criterio útil para determinar la calidad de un alimento.

El análisis de cenizas se fundamenta en que la muestra se incinera o calcina a 550 °C en una mufla por un período de 2 horas para quemar todo el material orgánico, quedando sólo el material inorgánico (ceniza) que no se destruye a esta temperatura.

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

Nota: En todos estos pasos del análisis se debe tener la precaución de usar pinzas de metal para manipular los crisoles.

- Colocar el crisol limpio y bien identificado en la mufla, calentar a 550°C por 1 hora.
- Sacar el crisol del horno, colocar en un desecador y enfriar durante 30 minutos. Pesar el crisol vacío, anotar el peso.
- Pesar aproximadamente 2.0 g de muestra directamente en el crisol de porcelana.
- Colocar el crisol en el horno de mufla y mantener a temperatura de 550 °C durante 2 horas, controlar tiempo y temperatura.
- Retirar el crisol de la mufla, colocar en el desecador durante 30 minutos y pesar (anotar este peso).

- Guardar la muestra de ceniza para la solubilización y determinación de minerales.

Cálculos

$$\text{Peso de muestra} = (\text{Peso}_{\text{crisol + muestra}}) - (\text{Peso}_{\text{crisol vacío}})$$

$$\text{Peso de la Ceniza} = (\text{Peso}_{\text{crisol + muestra después de incinerada}}) - (\text{Peso}_{\text{crisol vacío}})$$

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{Peso de la Ceniza}) (100\%)}{\text{Peso de muestra}}$$

f) Extracto Libre de Nitrógeno (ELN%)⁽²⁹⁾

Llamado también Extracto no Nitrogenado (Carbohidratos). Dentro de este concepto se agrupan todos los nutrientes no evaluados con los métodos señalados anteriormente dentro del análisis proximal.

Constituido principalmente por carbohidratos digeribles (como almidones y azúcares principalmente, sin embargo, también incluye cierta proporción de celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice y pectina), así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados. Se determina por la diferencia después de que se han completado los análisis para proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda y cenizas.

El Extracto libre de nitrógeno es necesario para encontrar el Total de Nutrientes Digeribles (TND) de un alimento. Este método no necesita de equipo de laboratorio y se obtiene por medio de la suma de las determinaciones de proteínas, grasa (extracto etéreo), fibra cruda y cenizas; el resultado de la suma se resta de 100% y se obtiene la cantidad de carbohidratos; debido a esto, los errores cometidos en la respectiva evaluación de cada uno de los nutrientes repercutirá en el cómputo final.

Cálculos

$$\% \text{ ELN} = 100\% - (\% \text{PC} + \% \text{EE} + \% \text{FC} + \% \text{C})$$

Dónde:

%PC = Porcentaje de Proteína Cruda

%EE = Porcentaje de Extracto Etéreo o Grasa

%FC = Porcentaje de Fibra Cruda

%C = Porcentaje de Cenizas.

ANÁLISIS DE VAN SÖEST

DETERMINACIÓN DE FIBRA NEUTRO DETERGENTE (FND) ⁽²⁹⁾

La determinación se fundamenta en que la muestra se hierve en una solución detergente neutra, la cual es capaz de solubilizar el contenido celular y la pectina. Dejando solo un residuo que es la pared celular que se refiere a celulosa, hemicelulosa y lignina.

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

- Pesar de 0.5 a 1.0 g de Mx seca y molida y colocarla muestra en el beaker de Berzeliuz.
- Añadir 100 ml de la solución FDN por las paredes.
- Colocar el beaker en el aparato de digestión de fibra y calentar hasta que empiece a ebulir, luego reducir la temperatura para evitar la formación de espuma y mantener a esta temperatura baja pero siempre con indicios de ebullición por una hora.

- Filtrar el contenido del beaker en un crisol de gooch previamente pesado después de transcurrida 1 hora de digestión, adicionar abundante agua destilada en ebullición varias veces hasta reducir la formación de espuma o grumo durante el filtrado al vacío.
- Lavar con acetona o alcohol (pequeña porciones).
- Secar luego el crisol en estufa a 100 °C durante 8 a 16 horas.
- Enfriar en desecador y pesar el crisol de gooch.

Cálculos

$$\%FDN = \frac{\text{Peso de crisol después de digerir} - \text{peso de crisol vacío}}{\text{Peso de muestra (g)}} \times 100$$

DETERMINACIÓN DE FIBRA ACIDO DETERGENTE (FAD) ⁽²⁹⁾

La determinación se fundamenta en que la muestra se pone a digerir en una solución ácido detergente en donde se hidrolizan los contenidos de celulosa que se encuentran libres y aquellas que están combinadas con la lignina, dejando la celulosa y la lignina como fibra detergente ácido (FAD).

Procedimiento (Ver Anexo N° 5)

- Pesar de 0.5 g a 1.0 g de muestra seca y molida y colocar en beaker de berzelius.
- Añadir 100 ml de la solución FAD al beaker que contiene la muestra y calentar en el digestor hasta que ebullición y luego disminuir la temperatura para evitar la formación de espuma y mantener hirviendo por 1 hora.
- Filtrar la muestra digerida en un crisol de gooch previamente pesado con agua destilada en ebullición, hasta eliminar completamente la espuma o grumos.

- Lavar con alcohol etílico o acetona y colocar en estufa el crisol a 100°C por 8 a 16 horas.
- Enfriar en desecador y pesar.

Cálculo

$$\%FAD = \frac{\text{Peso de crisol después de digerir} - \text{peso de crisol vacío}}{\text{Peso de muestra (g)}} \times 100$$

2.8 ANALISIS ESTADISTICO ⁽⁵⁶⁾

El diseño estadístico a utilizar es completamente al azar con 4 tratamientos (Mezclas de forrajes a base de gramínea – leguminosas en cuatro diferentes proporciones), cada una por quintuplicado.

Los 2 análisis químicos a evaluar fueron: Cuantificación de taninos totales por el método de Folin Ciocalteau y Cuantificación de taninos condensados o Proantocianidinas por el método de HCl – Butanol.

Para el análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio, se aplicó el análisis de varianza con el objeto de determinar si existen diferencia significativa entre la medias del material evaluado y si el factor (Mezclas de forrajes y sus proporciones) tiene alguna influencia en los resultados (Concentración de taninos), se aplicó la prueba “F” para el análisis de varianza con un nivel de significancia del 95%. ⁽⁵⁶⁾

Si existe alguna diferencia significativa se realizara por medio de la prueba de Duncan para medias. El número total de análisis que realizaremos es de 640 análisis, que detallamos a continuación:

Tabla N°2. Cuantificación del número de análisis a realizar por cada tratamiento según el número de muestras

Mezcla	Proporción	Número de repeticiones	TOTAL DE ANALISIS
S-2 + C	50:50	5	20
	60:40	5	
	70:30	5	
	80:20	5	
S-2 + V	50:50	5	20
	60:40	5	
	70:30	5	
	80:20	5	
RCV+C	50:50	5	20
	60:40	5	
	70:30	5	
	80:20	5	
RCV+V	50:50	5	20
	60:40	5	
	70:30	5	
	80:20	5	
		TOTAL	80

La tabla anterior, nos presenta el número de análisis por 4 tratamientos en sus cinco repeticiones para los 2 análisis de cuantificación de taninos, tomando en cuenta la precipitación de compuestos no fenólicos por acción del PVPP, a los que les hicimos el análisis estadístico, tenemos:

$$80 + 80 + 80 = 240 \text{ análisis}$$

CAPITULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de forrajes (ensilado) de una gramínea sorgo (*Sorghum bicolor*) en sus variedades CENTA S-2 y CENTA RCV y leguminosas: Frijol espada/Canavalia (*Canavalia ensiformis*) y Frijol mono (*Vigna sinensis*) en la Asociación Cooperativa Astoria, que sirvieron como patrón para la elaboración de mezclas en cuatro diferentes proporciones (80:20), (70:30), (60:40) y (50:50) de gramínea y leguminosa respectivamente.



Figura N°10. Recolección de muestras de forraje ensilado

5.2 Preparación de muestras

Se prepararon cuatro diferentes mezclas S-2 + C, S-2 +V, RCV + C y RCV + V en cuatro diferentes proporciones (80:20), (70:30), (60:40) y (50:50), que posteriormente fueron deshidratadas y luego molidas con la ayuda de un molino con un tamiz de 0.25mm de diámetro para obtener mezclas con tamaño de partícula uniforme y homogéneo.



Figura N°11. Preparación de muestras (Molido)

5.3 Preparación del extracto

Después que las muestras fueron deshidratadas y molidas, se procedió a la extracción de taninos con acetona al 70% en cada una de las mezclas en sus diferentes proporciones



Figura N°12. Preparación del extracto para la determinación de taninos

5.4 Cuantificación de taninos por el método espectrofotométrico Folin Ciocalteu (Ver anexo N°10)

En el cuadro N°1, se detalla el contenido promedio en porcentaje de taninos totales que presentaron cada una de las muestras de forrajes a base de una gramínea Sorgo (*Sorghum bicolor*) y dos leguminosas: Frijol Espada/Canavalia (*Canavalia ensiformis*) y Frijol Mono (*Vigna sinensis*) en sus diferentes proporciones (50:50), (60:40), (70:30) Y (80:20).

Cuadro N°1. Resultados de la cuantificación de taninos totales por método de Folin Ciocalteu.

Mezcla	Proporción	TANINOS TOTALES (%)
S -2 + C	50:50	0.272
	60:40	0.991
	70:30	1.299
	80:20	1.457
S -2 + V	50:50	1.081
	60:40	1.328
	70:30	2.025
	80:20	3.055
RCV + C	50:50	0.530
	60:40	0.848
	70:30	1.045
	80:20	1.615
RCV +V	50:50	0.603
	60:40	0.821
	70:30	1.317
	80:20	1.523

Se cuantificó el contenido de taninos totales de cada uno de los extractos elaborados por quintuplicado, la cual se determinó por medio de cálculos matemáticos, en donde se realizó una resta usando los resultados de taninos totales y compuestos fenólicos obtenidos por el método de Folin Ciocalteu y los resultados obtenidos al utilizar el reactivo de PVPP que precipita los compuestos fenólicos que no son taninos, ambos comprendidos en el extracto con acetona al 70%. Para una mejor comprensión de los resultados de la concentración de taninos totales, presentamos la siguiente grafica (Figura N°13):

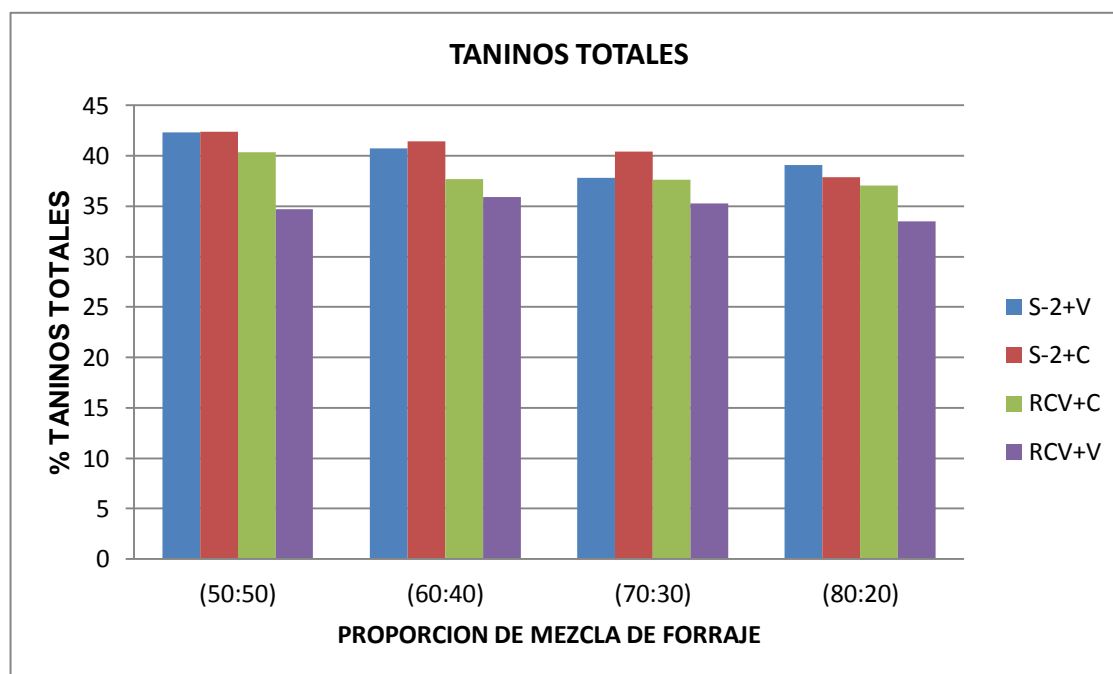


Figura N°13: Porcentaje de taninos totales en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)

Como podemos observar en el gráfico (ver figura N°13) a medida que aumentamos la proporción de una fuente forrajera a base de una gramínea (de 50% a 80%); se observa un aumento en el contenido de taninos totales, pero el

mayor aumento se observa en la mezcla de forraje de sorgo (*Sorghum bicolor*) en su variedad CENTA S-2 con Frijol Mono (*Vigna sinensis*) en las proporciones (70:30) y (80:20) y la que presento menor contenido de taninos totales fue Sorgo (*Sorghum bicolor*)y Frijol Espada/Canavalia (*Canavalia ensiformis*)en la proporción (50:50); pero en ninguno de los casos estudiados (fuentes forrajeras y mezclas en sus diferentes proporciones); excede el valor máximo permitido. Por lo que se podría decir que la formación tanino – proteína para este caso causaría poco o ningún efecto negativo en el ganado. Ya que según los estudios reportados en otras investigaciones demostraron que los forrajes con contenidos de taninos menores del 2 al 4%₍₁₄₎ de materia seca no produjeron efectos negativos en la alimentación como en la producción animal.

5.5 Cuantificación de taninos por el método espectrofotométrico Proantocianidinas (HCl – Butanol)(Ver anexo N°10)

Se cuantificó el contenido de taninos condensados por el método de proantocianidinas (HCl-Butanol) a partir de los extractos de cada una de las mezclas y proporciones de forrajes, cada una por quintuplicado, con una sola alícuota tomada de 0.5 mL de extracto con acetona al 70 % y se trató con 0.5 mL de agua destilada, 3.0 mL de reactivo de HCl – Butanol y 0.1 mL de reactivo de Sulfato Férrico Amónico, dando lugar a la formación de una complejo coloreado rojo que se leyó espectrofotométricamente a 550 nm, con dichas absorbancias realizamos el cálculo matemático mediante la fórmula (Absorbancia de la muestra tomada a 550 nm x 78.26 (factor de corrección establecido) x Factor de Dilución) (%MS), se obtuvieron valores de concentración de taninos condensados que son explicados en el cuadro N°2:

Cuadro N° 2 Resultados de taninos condensados por método de Proantocianidinas

Mezcla	Proporción	TANINOS CONDENSADOS (%)
S -2 + C	50:50	0.094
	60:40	0.134
	70:30	0.152
	80:20	0.163
S -2 + V	50:50	0.162
	60:40	0.163
	70:30	0.197
	80:20	0.198
RCV + C	50:50	0.133
	60:40	0.167
	70:30	0.170
	80:20	0.174
RCV +V	50:50	0.128
	60:40	0.172
	70:30	0.184
	80:20	0.202

En el grafico (Figura N°14), se expresan los resultados presentados en el cuadro N°2, en donde podemos observar que los mayores porcentajes de taninos condensados, se encuentran en las mezclas de Sorgo CENTA RCV + Frijol Mono en la proporción (80:20) pero la concentración no llega a sobrepasar el límite máximo permitido (2 - 4%), por lo que el alimento en ninguna de las mezclas y proporciones presentaría un efecto negativo significativo al ser suministrado al ganado.

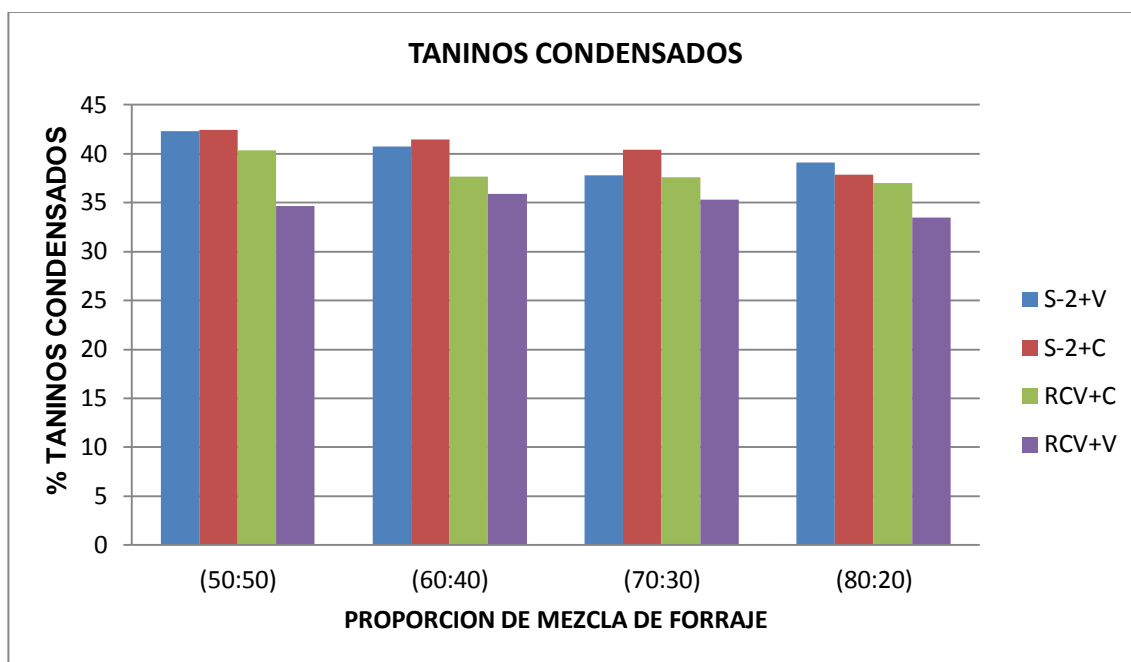


Figura N°14. Porcentaje de taninos condensados en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)

Como podemos comprobar en la figura N°14 ninguna de las variables en estudio presentaron resultados referentes a taninos condensados por debajo del 0.2% de taninos en base seca. Por lo que no superan el valor máximo permitido (2 – 4%)⁽¹⁴⁾ por lo que se presume que no afectaría directamente en la alimentación del ganado y la producción láctea.

Según Vaithiyathan y Kumar se reporta que la principal característica química de los taninos es la capacidad que tienen de formar complejos estables con las proteínas precipitándolas y protegiéndolas de la digestión y del ataque de la flora microbiana del rumen y enzimática haciendo a la proteína indigestible.⁽⁵¹⁾

Lo anterior afecta tanto el consumo de materia seca como el adecuado desdoblamiento de carbohidratos, proteínas y la adecuada utilización de energía en el ganado vacuno; pero estos afectan de acuerdo a la concentración

en la que se encuentran en la planta y el nivel del suministro del forraje en la dieta. ⁽⁵¹⁾

5.6 Análisis Bromatológico proximal

Se realizó el análisis bromatológico proximal por el método de Wendee para conocer el contenido nutricional y composición química de cada una de las mezclas, los análisis se realizaron por quintuplicado y se obtuvieron los siguientes resultados promedios:

Cuadro N°3. Resultados de la calidad nutricional de las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones por el método de Wendee.

Mezcla	Proporción	MS%	PC%	EE%	FC%	CENIZA %	ELN%
S -2 + C	50 : 50	21.52	12.69	2.9	25.09	9.64	49.68
	60 : 40	22.16	10.82	2.4	25.67	9.66	51.45
	70 : 30	23.01	10.95	3.4	26.08	9.57	50.00
	80 : 20	22.04	9.99	3.3	27,18	8.82	50.71
S -2 + V	50 : 50	18.78	11.6	2.8	24.33	9.79	51.48
	60 : 40	20.2	10.21	2.2	25.67	8.58	53.34
	70 : 30	20.58	9.73	2	26.18	8.99	53.10
	80 : 20	21.67	8.91	1.9	27.56	8.27	53.36
RCV + C	50 : 50	21.18	13.31	2.4	22.45	8.46	53.38
	60 : 40	23.41	12.77	2.2	25.34	8.91	50.78
	70 : 30	23.38	10.81	3.8	26.38	7.88	51.13
	80 : 20	23.38	9.99	4.4	27.76	7.75	50.10
RCV +V	50 : 50	20.44	13.82	3.1	24.23	9.71	49.14
	60 : 40	20.81	10.49	3.2	25.45	8.4	52.46
	70 : 30	20.07	9.94	2.2	26.07	8.42	53.37
	80 : 20	20.44	9.77	2.9	27.12	8.13	52.08

Abreviaturas: %MS (Materia Seca), %PC (Proteína Cruda), %EE (Extracto etéreo), %FC (Fibra Cruda), %C (Cenizas)

Por otro lado, también evaluamos la calidad nutricional por el método de Van Soest, en donde conocimos la parte digerible o aprovechable y la no digerible o no aprovechable del alimento por parte del animal, por lo que obtuvimos los siguientes resultados promedio, que son detallados en el siguiente cuadro:

Cuadro N°4. Resultados de la calidad nutricional de las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones por el método de Van Soest.

Mezcla	Proporción	FND%	FAD%
S -2 + C	50 : 50	62.63	42.32
	60 : 40	60.02	40.71
	70 : 30	57.14	37.79
	80 : 20	61.75	39.1
S -2 + V	50 : 50	60.88	42.41
	60 : 40	61.81	41.44
	70 : 30	61.10	40.42
	80 : 20	61.11	37.88
RCV + C	50 : 50	57.78	40.34
	60 : 40	55.06	37.69
	70 : 30	56.07	37.62
	80 : 20	54.51	37.03
RCV +V	50 : 50	54.3	34.68
	60 : 40	55.24	35.91
	70 : 30	55.87	35.28
	80 : 20	55.72	33.47

Abreviaturas: %FND (% Fibra Neutro Detergente), %FAD (% Fibra Acido Detergente).

METODO DE WENDEE

Contenido de Materia Seca (MS%)(Ver cuadro N°3)

El porcentaje de materia seca fue menor del 25% ⁽³⁷⁾ en todas las mezclas de forrajes por lo que no se puede considerar que estos cultivos pudieron ser cosechados en edades tempranas que no pudieron ser cosechadas en este estudio por diferentes factores ajenos al estudio. (Ver figura N°15)

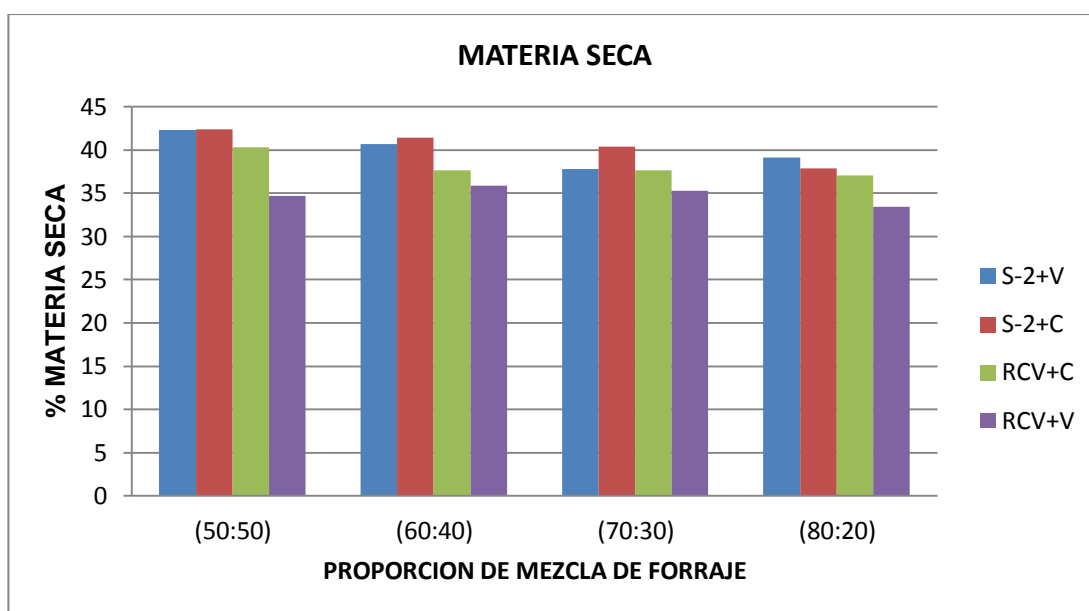


Figura N°15. Porcentaje de materia seca en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna).

Pero al observar el gráfico, comprobamos que el comportamiento de materia seca para la mezcla (CENTA RCV + C) en sus diferentes proporciones (50:50), (60:40), (70:30) y (80:20) es bien marcado, de la misma manera para las demás mezclas que se encuentran en mayores proporciones como el caso de la proporción (80:20) presenta mayor valor de materia seca y en proporciones

como (50:50) se observan valores menores, esto se mide por la presencia de agua que poseen en su interior las mezclas de forrajes. ⁽⁵⁾

Por otro lado, se observa que aquellas mezclas de forraje que incluyen tanto sorgo en su variedad CENTA S - 2 como sorgo variedad CENTA RCV con Frijol mono (*Vignasinensis*), presentaron un menor porcentaje de materia seca que los forrajes hechos con las mezclas a base de Frijol Espada/Canavalia (*Canavaliaensiformis*), esto se debe a que el frijol mono(*Vignasinensis*) absorbe mucha más agua que el frijol espada/Canavalia; Estudios realizados sobre ensilados a base de leguminosas en el año 2005 han demostrado que los excesos de humedad son perjudiciales para los microsilos ya que estos tienden a pudrirse y como las leguminosas son difíciles de ensilar, se recomienda realizar un proceso de predeshidratación al momento de su cosecha para reducir el contenido de humedad.⁽⁵⁾

Además las leguminosas no contienen suficientes carbohidratos fermentables que promuevan una fermentación láctica activa, lo que permite el desarrollo de Clostridios responsables de la fermentación secundaria que transforma el ácido láctico en butírico y degradan proteínas y aminoácidos, aumentando el nivel de nitrógeno amoniacal. ⁽⁵⁾

La mayoría de los microsilos de trinchera o montón normalmente poseen arriba del 25% de materia seca, debido que pueden escurrir el agua que contienen, mientras que en las mezclas de forrajes de este estudio, no se podía escurrir el agua ya que fueron elaborados con bolsas plásticas completamente selladas y no hubo pérdida de agua durante el proceso de compactación y fermentación.⁽³⁷⁾

Proteína Cruda (PC%)(Ver cuadro N°3)

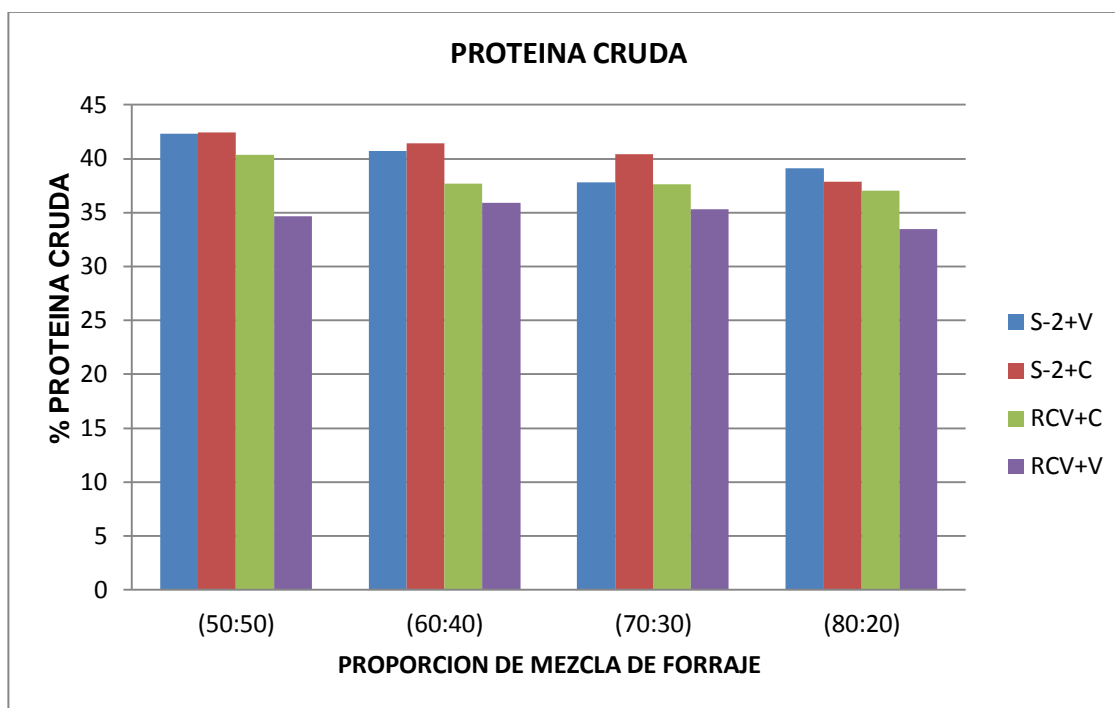


Figura N°16. Porcentaje de proteína cruda en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)

Como se observa en el gráfico los porcentajes de proteína cruda fueron decreciendo a medida que se aumentaba la proporción de forraje a base de gramínea en sus diferentes variedades; presentando los valores mas altos la proporción de mezcla de 50-50% (gramínea-leguminosa) que fueron de 12.69% de PC para la mezcla de forraje (S – 2 + C) ; 11.60%PC para la mezcla (S – 2 +V); 13.31 % de PC para (RCV + C) y 13.82% de PC para la mezcla (RCV + V) . Y los valores mínimos de proteína cruda correspondieron a la proporción de (80:20), con valores de 9.99% de PC para la mezcla (S-2 +C), 8.91% (S-2 + V), 9.99% (RCV + C) y 9.77% (RCV + V).

Por lo que se comprueba que a medida que se aumenta en un 10% el contenido de fuentes forrajeras a base de leguminosas, se aumentará desde un 20 a un 50% el valor de la proteína cruda (Ver anexo N°7). Además, se observó que las mezclas que contenían Frijol Espada/Canavalia (***Canavalia ensiformis***) fueron significativamente mayores o similares a las mezclas que contenían Frijol Mono (***Vigna sinensis***).

Estos datos muestran que la adición de leguminosas a los ensilados de sorgos es una buena alternativa ya que se ve incrementado el contenido proteico del material forrajero, lo cual puede permitir alcanzar los niveles recomendados de 15 al 17 % de proteína cruda en las raciones totales de vacas lecheras con producciones de 8 a 25 botellas por día (NRC 2001), utilizando una menor cantidad de fuentes proteicas.

Además en este estudio el contenido de PC obtenidos fueron mayores a los reportados por Jiménez *et al*₍₃₇₎ que para el cultivo de ***Canavalia ensiformis*** y ***Zea mays*** asociados sin ensilar presenta 8.67 % y en ensilado 8.68 % (70:30) de ***Zea mays*** y ***Canavalia ensiformis*** respectivamente.

Se comprueba que nuestros resultados fueron similares a otros estudios referentes al frijol mono (***Vigna sinensis***) en asocio con maíz ***Zea mays***; ya que esos resultados presentados por Castillo *et al*₍₂₀₎ a una mezcla de 70:30 fueron de 9.45% y para una mezcla de 60:40 fue de 10.52 %. Donde en nuestro estudio podemos comprobar que no existió alguna variación en el contenido de proteína; además Arteta₍₅₎ menciona que la adición de un 25% de leguminosa ***Mucuna pruriens*** al ensilado de ***Zea mays***, mejora sustancialmente el contenido de Proteína Cruda. ₍₅₎

Contenido de Extracto etéreo (EE%)(Ver cuadro N°3)

Los porcentajes de extracto etéreo son menores al 5% en todas las proporciones de las muestras de forrajes analizadas (Ver figura N°17)

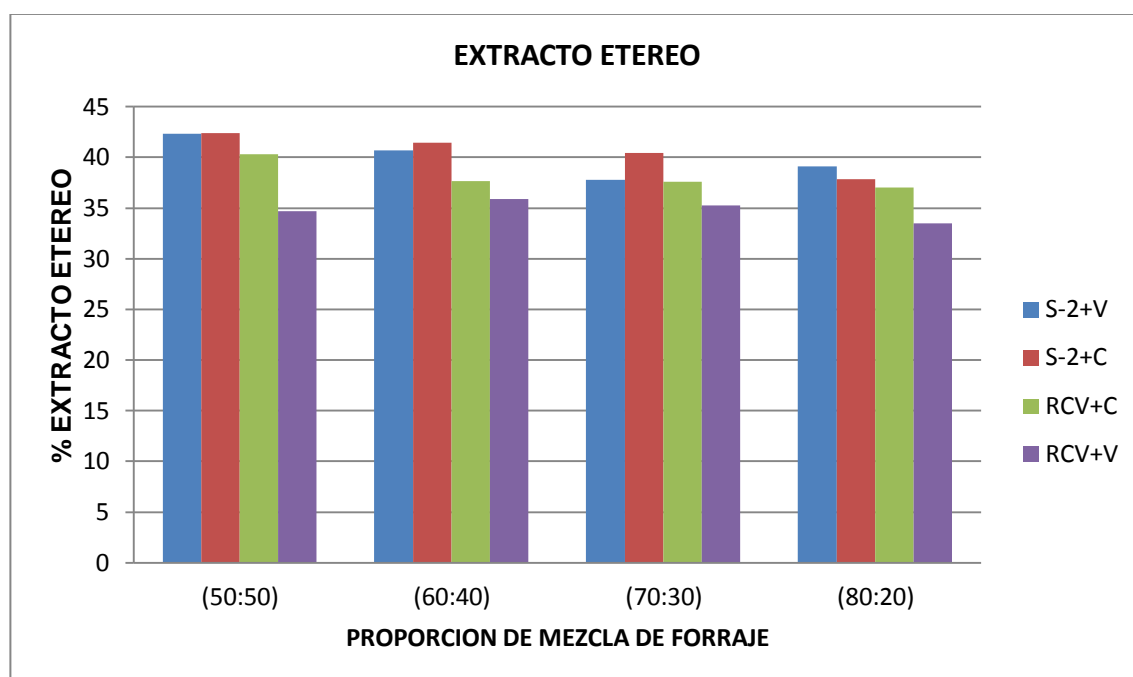


Figura N°17. Porcentaje extracto etéreo (grasas) en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)

Como se puede observar en el gráfico anterior (Figura N° 17), el porcentaje de EE% se mantuvo sin diferencia significativa entre las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones, teniendo como valor mayor 4.4% que pertenece a la mezcla (CENTA RCV + C) en proporción (80:20), y como valor mínimo 1.9% que le corresponde a la mezcla (CENTA S-2 + V) en proporción (80:20).

Contenido de Fibra Cruda (FC%)(Ver cuadro N°3)

Después de la determinación de Fibra Cruda en las mezclas de forrajes a base de una gramínea Sorgo (*Sorghum bicolor*) y dos leguminosas Frijol

Espada/Canavalia (*Canavalia ensiformis*) y Frijol Mono (*Vigna sinensis*), obtuvimos ciertos resultados que son explicados de mejor manera en el siguiente gráfico ya que nos permite evaluar el comportamiento de cada variable de la siguiente manera:

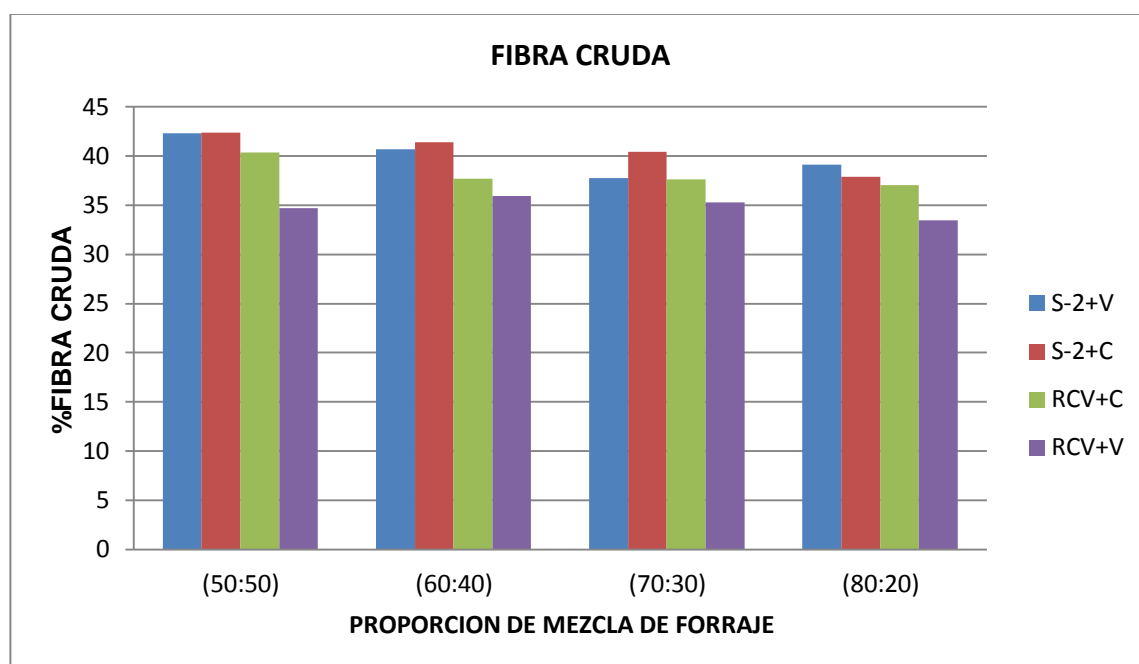


Figura N°18. Porcentaje de Fibra Cruda en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgo (CENTA RCV Y CENTA S-2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)

Como podemos observar en el gráfico anterior (Ver figura N°18), obteniendo como valor máximo de fibra cruda 27.76% que lo presenta la mezcla forrajera RCV + C en proporción (80:20) y como valor mínimo de fibra cruda 22.45% presentada en la mezcla RCV + C en la proporción (50:50); en general, por la representación gráfica, podemos apreciar que entre los valores de fibra cruda no hay mucha diferencia entre las diferentes mezclas y proporciones de los forrajes evaluados. Por otra parte, los valores máximos de fibra cruda los obtuvieron las diferentes mezclas en proporciones (80:20), ósea que a mayor porcentaje de gramínea y menor porcentaje de leguminosa hay un mayor

contenido de fibra cruda. Con los contenidos de fibra cruda obtenidos, podemos afirmar que la pared celular de las plantas tiene una estructura compleja compuesta de celulosa y hemicelulosa, pectina, sustancias nitrogenadas lignificadas, ceras, cutina y componentes minerales. Este material se divide a su vez en sustancias insolubles de la matriz, que incluyen la lignina, celulosa y hemicelulosa, y las más solubles como la pectina, ceras y proteína, que se pueda extraer.⁽²⁹⁾

Como ya sabemos, la fibra representa la porción no digerible de los alimentos y, por consiguiente, mientras mayor sea su concentración en un producto dado, menor será su valor alimenticio, aunque es importante recomendarlo para el buen funcionamiento del intestino. La naturaleza química de la fibra cruda, aun cuando no está bien establecida, se considera constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina. Su determinación se basa en la simulación de la digestión en el organismo por tratamientos ácidos y alcalinos, separando los constituyentes solubles de los insolubles que constituyen los desperdicios orgánicos a través de las heces. ⁽⁴⁹⁾

Contenido de Cenizas (C%)(Ver cuadro N°3)

Los porcentajes de cenizas son menores al 10% en todas las proporciones de las muestras de forrajes analizadas, estos resultados son materia inorgánica presente en las muestras de forrajes en sus diferentes proporciones en las que fueron analizadas, al restarles 100 menos la materia inorgánica nos da el % de materia orgánica que está presente en las muestras, que oscila entre 90 a 93%.⁽²⁹⁾

En la figura N°19 se pueden observar los porcentajes de cenizas para cada una de las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones

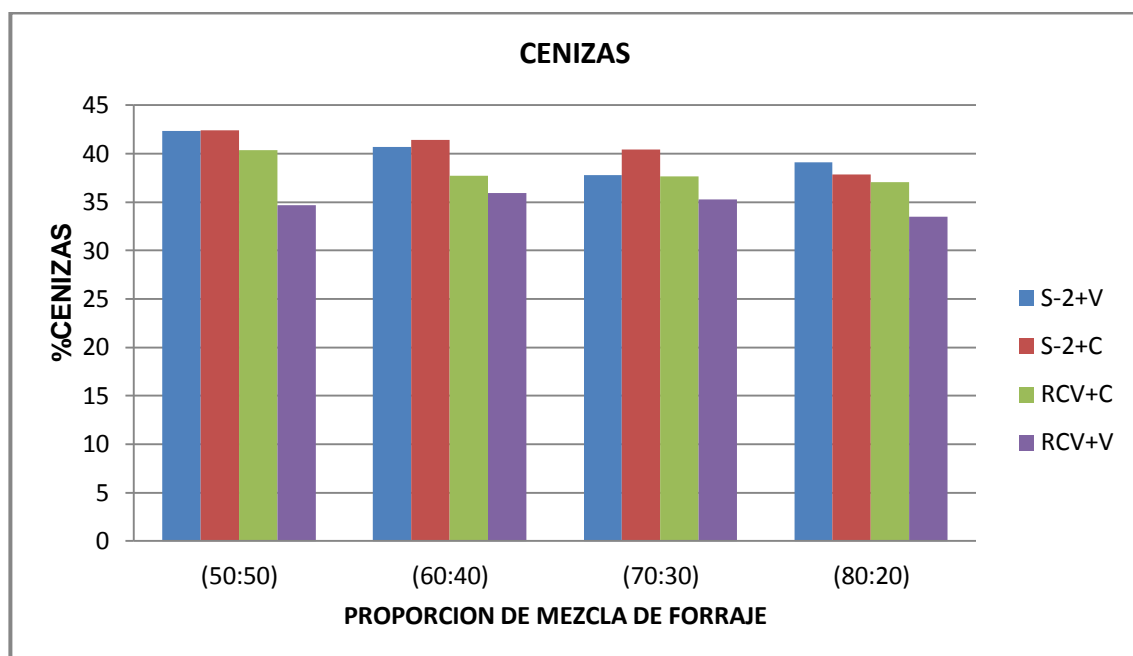


Figura N°19: Porcentaje de cenizas (materia inorganica) en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S- 2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)

Según el gráfico anterior, concluimos que la mezcla (CENTA S-2 + V) en proporción (50:50) presenta mayor C% con 9.79% y la mezcla que presento menor C% fue (CENTA RCV + C) en proporción (80:20) con 7.75%, en cada una de las mezclas de forrajes no hay diferencia significativa en los resultados ya que todos oscilan entre los mismos valores (7.75% - 9.79%).

La fracción inorgánica de los alimentos tiene un gran valor nutritivo, generalmente se le determina con el término “cenizas”.Las cenizas de los productos alimenticios están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha quemado. ⁽²⁹⁾

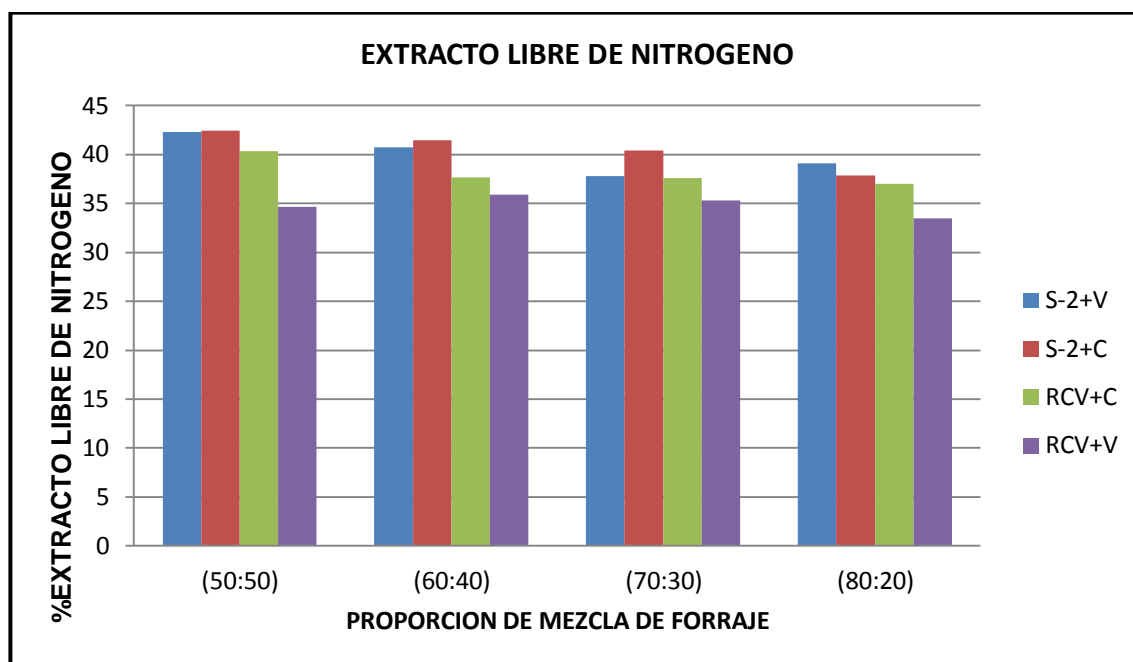
Las cenizas obtenidas no tienen necesariamente la misma composición que la materia mineral presente en el alimento original ya que pueden haber existido pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes. En las

cenizas aparecen todos los minerales menos yodo y selenio porque se volatilizan.

El valor de las cenizas puede considerarse como una medida general de la calidad y a menudo es un criterio útil para determinar la cantidad de un alimento. ⁽²⁹⁾

Contenido de Extracto Libre de Nitrógeno (ELN%)(Ver cuadro N°3)

Se determinó por la diferencia después de que se han completado los análisis para proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda y cenizas, y la representación gráfica de este comportamiento se detalla a continuación:



FiguraN°20: Porcentaje de extracto libre de Nitrogeno (%ELN) en microensilados elaborados a diferentes proporciones de los cultivos de Sorgos (RCV y CENTA S-2) y leguminosas (Canavalia y Vigna)

En el grafico anterior, podemos apreciar que para los socios con sorgo CENTA RCV se observa que los valores máximos de extracto libre de nitrógeno oscilan entre 53.38% que corresponde a la mezcla forrajera (CENTA RCV + C) en la proporción (50:50) y 53.37% que corresponde a la mezcla forrajera (CENTA RCV + V) en la proporción (70:30); y los valores mínimos de extracto libre de Nitrógeno están comprendidos 49.14% que corresponde a la mezcla forrajera RCV + V en la proporción (50:50); pero también en los socios con sorgo CENTA S-2 se observa que los valores máximos de extracto libre de Nitrógeno se encuentra alrededor de 53.36% que corresponde a la mezcla (CENTA S-2 + V) en la proporción (80:20) seguido de 53.34% que corresponde a la mezcla (CENTA S-2 + V) en la proporción (60:40) y los valores mínimos para este socio andan por 49.68% que corresponde a la mezcla (CENTA S-2 + C) en la proporción (50:50) seguido de 50% que corresponde a la mezcla (CENTA S-2 + C) en la proporción (70:30); por lo que podemos concluir que entre los valores no hay discrepancia ya que no hay diferencias entre ellos.

El extracto libre de Nitrógeno está constituido principalmente por carbohidratos digeribles (como almidones y azúcares principalmente, sin embargo, también incluye cierta proporción de celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice y pectina), así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados. ⁽⁴⁹⁾

Dentro de este concepto se agrupan todos los nutrientes no evaluados con los métodos señalados anteriormente dentro del análisis proximal, constituido principalmente por carbohidratos digeribles, así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados; debido a que se obtiene como la resultante de restar a 100 los porcentos calculados para cada nutriente, los errores cometidos en su respectiva evaluación repercutirán en el cómputo final. ⁽⁴⁹⁾

METODO DE VAN SOEST

Contenido de Fibra Neutro Detergente (FND)₍₁₉₎(Ver cuadro N°4)

Existen varios factores que interactúan entre si y determinan la calidad final del alimento ensilado. Entre esos factores se encuentran Estado de madurez y contenido de humedad de la planta al momento del picado. ⁽²³⁾

El gráfico (Ver figura N° 21) muestra que las mezclas que contenían sorgo S-2 tenían más FND (60.88-62.63%) que las que tenían sorgo RCV (52.14-57.78%) mientras que en las proporciones, la FND estuvo entre valores medios conforme se incluyó más leguminosa desde 20% hasta 50%.

Se observó también que al agregarle leguminosa a sorgo CENTA S-2, la FND no presenta diferencia significativa mientras que en el sorgo RCV hay una ligera tendencia a aumentar.

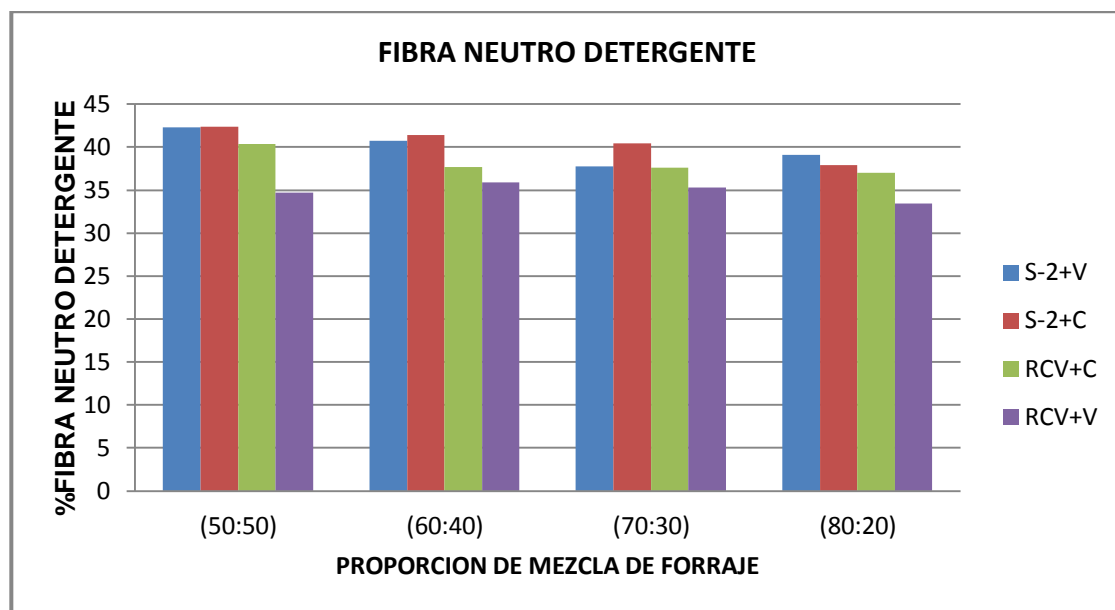


Figura N°21: Porcentaje fibra neutro detergente en microensilados elaborados con sorgo CENTA S-2 y RCV mezclados con leguminosas Canavalia y Vigna a diferentes proporciones.

Los resultados obtenidos en contenido de FND fueron mayores a los reportados por Jiménez *et al* ⁽³⁷⁾ para el asocio de los cultivos de *Zea mays* y *Canavalia ensiformis* (70:30) sin ensilar fue 41.83% y en ensilado 41.95%.

Mientras que Castillo *et al* ⁽²⁰⁾ reportó que *Zea mays* y *Vigna sinensis* en proporción (70:30) fue de 51.39 %; y de proporción 60.40 fue de 54.29 %.

Contenido de Fibra Acido Detergente (FAD) ⁽¹⁹⁾(Ver cuadro N°4)

En el grafico siguiente (Ver figura N° 22) se observó que las mezclas que contenían sorgo CENTA S-2 tuvieron mayor contenido de FAD que las que contenían sorgo RCV, además se encontró que a medida se adicionaba leguminosa al forraje, los valores de fibra no presentaron diferencias significativas.

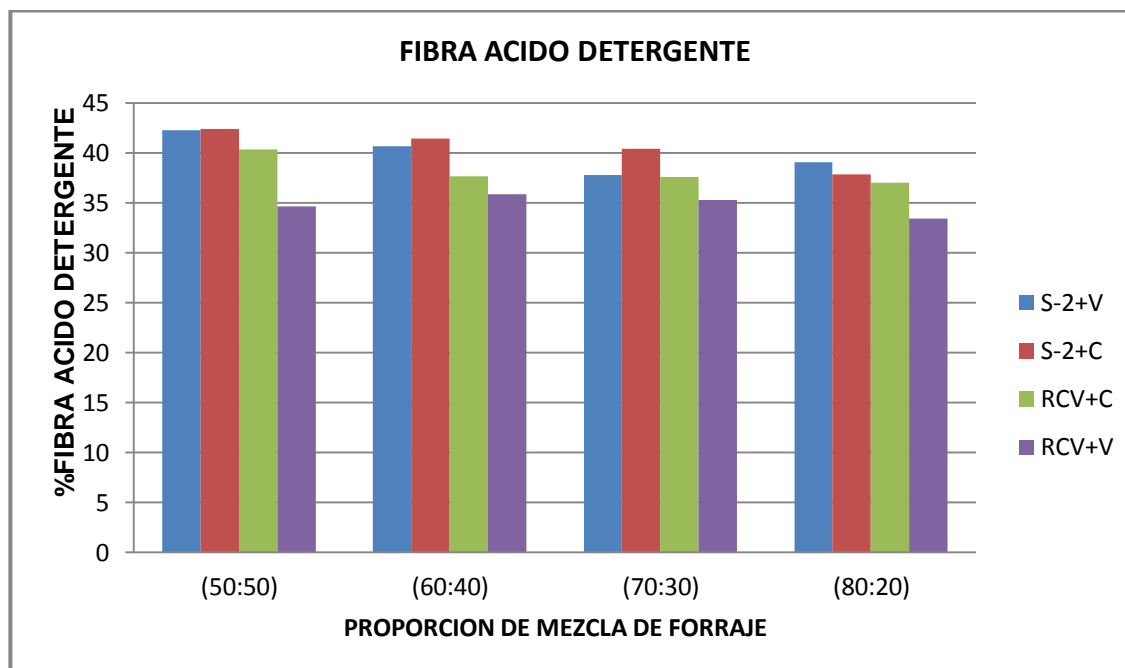


Figura N° 22: Porcentaje de fibra ácido detergente en microensilados elaborados con sorgo CENTA S-2 y RCV mezclados con leguminosas Canavalia y Vigna a diferentes proporciones.

Sin embargo esto debe interpretarse en el contexto de las condiciones de este experimento, donde al momento de la cosecha, el contenido de FAD de los sorgos fue muy bajo por efecto del llenado de la panoja.

Para este estudio los resultados obtenidos en cuanto a FAD fueron mayores a los reportados por Jiménez *et al.*⁽³⁷⁾ para el asocio de los cultivos de ***Zea mays*** y ***Canavalia ensiformis*** sin ensilar fueron de 29.51 % y en ensilado 25.33 %. En ***Zea mays*** y ***Vigna sinensis*** los resultados presentados por Castillo *et al.*⁽²⁰⁾ para una mezcla de (70:30) fueron de 29.44 % y para una mezcla de (60:40) fue de 32.18 %

5.7 Análisis estadístico (Ver anexo N°10)

Se realizó por la prueba “F” para el análisis de varianza para comprobar si existía alguna diferencia significativa entre las medias de los resultados obtenidos de la cuantificación de taninos totales y taninos condensados, con lo que se obtuvieron valores de F cálculos y se compararon con los valores de F de tabla (Ver anexo N° 11). Los cuales sirvieron de parámetro para conocer o comprobar si existía alguna diferencia significativa entre los valores medidos, y para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$F_{\text{CALCULADO}} > F_{\text{TABLA}} = \text{Hay diferencia significativa al 5\%}$$

Los resultados que se obtuvieron demostraron lo siguiente:

- Para la cuantificación de taninos totales por el método de Folin Ciocalteu obtuvimos un F de 1.99, como se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla N° 3. Análisis de varianza para la concentración de Taninos totales en las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones.

	GL	SC	CM	F _{CALCULADO}	F _{TABLA}
TRATAMIENTO	3	2.1539	0.7180	1.99	3.41
ERROR	12	4.3328	0.3611		
TOTAL	15				

En el análisis estadístico para la cuantificación de taninos condensados por el método de proantocianidinas o HCl-Butanol obtuvimos un F de 2.14, como se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla N°4. Análisis de varianza para la concentración de Taninos condensados en las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones.

	GL	SC	CM	F _{CALCULADO}	F _{TABLA}
TRATAMIENTO	3	0.0045	0.0015	2.14	3.41
ERROR	12	0.0080	0.0007		
TOTAL	15				

Con respecto a los datos obtenidos en el análisis estadístico (Ver pagina N°74) podemos observar que el resultado del contenido de taninos para cada una de las mezclas de forrajes, reportan que no hay diferencia significativa, ya que nos proporcionan resultados confiables y se puede observar que únicamente en la mezcla de forraje (S-2+V) en la proporción (80:20) presenta un pequeño aumento en los resultados que no sobrepasan los límites permitidos de taninos y no son lo suficientemente altos como para reportar una variación significativa según la Distribución F para análisis de varianza, ya que los valores de F calculados a partir de los promedios de los porcentajes de taninos por quintuplicado para cada una de las mezclas y proporciones de forrajes a base de sorgo (*Sorghum bicolor*) y dos leguminosas: Frijol Espada/Canavalia

(*Canavalia ensiformis*) y Frijol Mono (***Vigna sinensis***) resultaron ser menores al ser comparados con el valor de F de tabla, por lo que ninguna de las mezclas en ninguna de las proporciones presenta diferencia significativa entre ellas, además los resultados obtenidos, determinan que ninguna mezcla de forraje produce algún efecto nocivo en la alimentación del ganado vacuno

CAPITULO VI

6.0 CONCLUSIONES

1. Los valores obtenidos con respecto a la concentración de taninos totales por el método de Folin Ciocalteu (0.272% valor mínimo y 3.055% valor máximo) se encuentran por debajo del valor máximo permitido (2 – 4%), por lo que concluimos teóricamente que estas mezclas no presentan efectos negativos en la alimentación del ganado vacuno.
2. Los valores obtenidos con respecto a la concentración de taninos condensados por el método de Proantocianidinas o HCl-Butanol (0.094% valor mínimo y 0.202% valor máximo) se encuentran por debajo del valor máximo permitido (2 – 4%), por lo que podemos afirmar que no existiría efecto negativo significativo al alimentar al ganado con estas mezclas de forrajes ensilados.
3. Entre las muestras de forrajes en sus diferentes proporciones no existe una diferencia significativa entre las medias de los resultados obtenidos, pudiéndose afirmar que dichas muestras en sus diferentes proporciones pueden ser suministradas al ganado vacuno ya que no producirían efectos negativos en cuanto a la precipitación del complejo tanino – proteína.
4. Los valores obtenidos por medio del análisis bromatológico proximal (Método de Wendee y método de Van Soest) nos dieron a conocer la composición centesimal de estas especies vegetales en cuanto a la presencia de materia seca (23.38% valor máximo), proteínas (13.82% valor máximo), extracto etéreo (4.4% valor máximo), fibra cruda (27.76%), Cenizas (9.79% valor máximo), carbohidratos (53.38% valor máximo), Fibra neutro detergente

(63.63% valor máximo) y Fibra ácido detergente (42.41% valor máximo) que son necesarios para el desarrollo del ganado y son los responsables de que podría existir una mayor producción láctea que se puede ver aumentado por el asocio de gramínea y leguminosas.

5. El asocio de la gramínea sorgo (*Sorghum bicolor*) presento mejores rendimientos de materia seca con la leguminosa *Canavalia ensiformis* que con *Vigna sinensis*, por ser esta ultima una especie vegetal rastrera y poseer un sistema radicular profundo tiene la desventaja de captar más agua y presentar mayores problemas de ensilaje si no se hace de la manera adecuada.

CAPITULO VII

7.0 RECOMENDACIONES

1. En estudios posteriores realizar cuantificación de taninos en otras mezclas de fuentes forrajeras para que puedan ser utilizadas como una alternativa para alimento de ganado lechero para favorecer a la producción láctea.
2. Realizar estudios posteriores con estas especies (frijol canavalia (*Canavalia ensiformis*) y el frijol vigna (*Vigna sinensis*) y Sorgo (*Sorghum bicolor*) de las variedades Centa RCV y Centa S-2.), en donde se evalué la fenología de diferentes fechas de corte; para conocer así, si su contenido nutricional (Proteína, Materia seca, Fibra cruda, Cenizas, carbohidratos, Concentración de taninos) aumenta o disminuye con relación a la edad de la planta, por la posible presencia de vaina en las leguminosas y grano en el sorgo que pueden afectar el consumo de alimento y por ende la producción láctea.
2. Evaluar en la Asociación Cooperativa Astoria estas mezclas a través del consumo voluntario para poder ser utilizadas como alimento para su ganado ya que su asocio presenta efectos positivos en cuanto al aumento del contenido proteico y de fibra, y además el contenido de taninos que estas mezclas presentan no es lo suficientemente significativo como para causar un efecto negativo en el ganado, y presentar la posibilidad de reducir la presencia de materias primas a base de granos los cuales podrían reducir los costos de elaboración y por ende aumentar la producción láctea.

3. Realizar estudios posteriores que evalúen los volúmenes y calidad nutricional de la producción de leche al ser el ganado vacuno alimentado con cualquiera de estas cuatro mezclas de forrajes ensilados en las diferentes proporciones y comprobar de esta misma forma que forraje produce los mayores volúmenes de leche al menor costo de alimentación animal y costo de producir el material forrajero.

4. Para estudios posteriores evaluar otras muestras de forrajes que sirvan de control o de parámetro y que sean tratados de igual manera que en esta investigación, y los resultados sean comparados para la creación de nuevas mezclas alternativas para la alimentación de ganado vacuno.

BIBLIOGRAFIA

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemistry), 1970. Official Analytical Chemists- 11th Ed. Washington. DC. Published by the Association of Official Chemists.1015 p.
2. Aleman, R; Flores M. Algunos datos sobre Canavalia. Honduras, CIDICCO. 1993.
3. Alquicira Páez, Lizbeth, tesis para obtener el grado de especialista en biotecnología, universidad autónoma metropolitana, unidad iztapalapa, determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteína, México D.F. septiembre 2003.p21.Disponible en: <http://148.206.53.231/uami10692.pdf> [Consultado el 15.5.2011]
4. Angeles, S; Corona, L; Escamilla, J; Melgarejo, J; Spross A. Alimentación Animal. Forrajes y Concentrados. 2º edición. Universidad Autónoma de México, Coayacán, DF. 2002. p216.
5. Arteta, P.D; Zamora, W.D. Efecto de dos tipos de maíz con cuatro leguminosas sobre la cantidad y producción del ensilaje en El Zamorano, Honduras. Tesis. 2005. p24
6. Arthur Cronquist, Introducción a la botánica editorial continental s.a. primera edición 1969, p781, 787.
7. Asquith, T., Jzund C.C. Y Buttler, L.G. Characterization of the condensed tannin from a group II sorghum en: Journal agricultural and food chemistry. Volumen N°31 (6): 1299-1303.1983. Disponible en:

http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos_naturales/taninos_2.pdf [Consultado el 15.4.2011].

8. Barry, T.N; McNabb, W.C. The effect of condensed tannins in temperatura forages on animal nutrition and productivity. In tannins in Livestock and Human Nutrition. 1999. p30 – 35. Disponible en: www.aciar.gov.au. [Consultado 15-08-11]
9. Bavera, Guillermo Alejandro, méd. Vet., Profesor titular efectivo de producción bovina de carne, depto. Producción animal, facultad de agronomía y veterinaria, universidad nacional de río cuarto, río cuarto, provincia de córdoba, república argentina producción bovina de carne.
10. Bernal Pérez, C. Calendarización y Riesgos Climáticos del Maíz y Sorgo en la Planicie Costera Central con Base a la Estación Experimental y de Prácticas, la Providencia. Tesis Ing. Agr. El Salvador, San Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. 1990. p135.
11. Berlijn, JD. Cultivos Básicos. Cuarta Edición. México, DF, México Editorial Trillas, SA de CV. 2000. p72.
12. Binder U; Manual de leguminosas, tomo I, primera edición. PASOLAC, E.A.G.E. Estelí, Nicaragua. 1997. p191.
13. Binder U; Manual de leguminosas, tomo II, primera edición. PASOLAC, E.A.G.E. Estelí, Nicaragua. 1997. p528.

14. Cadahia Fernández E. Estudio de la composición tánica de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* [tesis doctoral]. Madrid: Complutense; 1995.
15. Campabadal C; Desarrollo de un Sistema Moderno de Nutrición y Alimentación para Vacas Lecheras. Asociación Americana de Soya. Primera Edición. ASA/ México, DF. 2000. p32.
16. Campabadal C; Navarro Gonzales, H; Nutrimientos Necesarios para Maximizar la Producción de Leche. Asociación Americana de Soya. Primera edición. ASA/México, DF. A.N.13. 1994. p10.
17. Campabadal C; Navarro Gonzales, H; Clasificación de los Ingredientes Utilizados en la Elaboración de Alimentos para Animales. Asociación Americana de Soya. Primera edición. ASA/México, DF. 1996. p21.
18. Cañas, F. Marcha analítica para análisis bromatológico o análisis proximal. Universidad de El Salvador. 2000.
19. Carmona Agudelo J. Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre la dinámica digestiva en bovinos. Revista Lasallista de Investigación. 2007; 4(1): 40-50.
20. Castillo, M; Rojas, A; Wingching- Jones, R. Valor Nutricional del Ensilaje de Maíz Cultivado en Asocio con Vigna (*Vigna radiata*). Agronomía Costarricense. 33:1, 2009. p136-146.
21. Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria Y Forestal (CENTA). Guía técnica Del Sorgo (*Sorghum Bicolor*). El Salvador. 2007. p40.

22. Church, D.C. El rumiante, fisiología digestiva y nutrición, ed. 2ª, Acribia, Zaragoza, España. 1993.
23. Cuadrado Capella, H; Mejía Kerguelen, S; Contreras Ávila, A; Romero Díaz, A; García Peña, J. Manejo agronómico de algunos cultivos forrajeros y técnicas para su conservación en la Región Caribe Colombiana. Centro de Investigación Turipaná. Cereté, Córdoba – Colombia. 2003. p26
24. Cuellar Guzman, S; Tobar Hercules, Lb; Zelaya Alvarez, Jw. Efectividad de Leguminosas (*Stizolobium deeringianum* y *Canavalia ensiformis*) Sembrados a Diferentes Épocas y en Asocio con Maíz (*Zea mays*) para el Control de Malezas y Mejoramiento para la Fertilidad del suelo. Tesis Ing. Agr. El Salvador, San Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. 1997. p118.
25. Cuevas Chavarria, E; Lopez Landaverde, R.A; Villalta Rodriguez, C. A. Efecto de los Sistemas de Labranza Convencional, Reducida y mínima en las Propiedades Físicas del Suelo y Comportamiento Bio – económico del cultivo de Vigna (*Vigna sinensis*) San Luis Talpa, La Paz. Tesis Ing. Agr. El Salvador, San Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. 1992. p202.
26. Estupiñán, K; Vasco, D; Duchi, N. Digestibilidad de los Componentes de la Pared Celular del Forraje de *Canavalia ensiformis* en Diferentes Edades de Corte. Revista Tecnológica ESPOL, Vol. 20. Universidad Tecnológica Estatal de Quevedo. Ecuador. 2007.

27. FEDNA, Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2ª ed.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 2003. p423
28. Fisiología vegetal 1/10/10 disponible en: <http://biologia-fisiovegetal.blogspot.com/archive.html>[Consultado el 13.4.2011]
29. Flores Tensos, J; Carranza Estrada, F; Bonilla De Torres, BI. Manual de Laboratorio de Análisis Bromatológicos. Universidad de El Salvador, Departamento de Química Agrícola. 2008. p28.
30. Grupo editorial océano, diccionario enciclopédico, edición 1997 p176, 731, 766, 692, 924, 1086, 1158, 1184,1318, 1552.
31. Guzmán Franco B, Zelaya Cerrato J. Control de calidad de materias primas utilizadas en la elaboración de tres tipos de concentrados para la alimentación de ganado lechero formulado a nivel de pequeña industria en fábrica Nacascolo [tesis doctoral]. El Salvador: Editorial Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer; 1998
32. Hahn, D .L Rooney, L.W. Y Earp C.F. Tannins and phenols of sorghum. Cereal Food World. Vol 29 (12): 776-779. 1984. Disponible en: http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos_naturales/taninos_2.pdf [Consultado el 03.5.2011]
33. Harinder P.S. Makkar. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. A laboratory manual. Animal production & health section join FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 2003. p43 – 54.

34. <http://www.infocarne.com> [Consultado 05.06.2011] Alimento para vacas lecheras.
35. Hughes, H.D. Forrajes Mexico CECSA 1966.
36. Introducción a la bioquímica, alcoholes, fenoles y esterres p.42 disponible en <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r44498.pdf> [Consultado el 13.4.2011]
37. Jimenez P.A.; Cortez R.H.; Ortiz, G.S.; Rendimiento Forrajero Y Calidad Del Ensilaje De Canavalia En Monocultivo Y Asociada Con Maíz. (L). Trabajo De Promoción En Proceso. Pdf. Palmira: Unc. 2004. Disponible En: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actaagronomica> [Consultado el 3.4.2011]
38. Jones, C.M.; Heinrichs A.J.; Roth G.W. And Ishler V.I. Understanding Silage Management. College of Agricultural Sciences. Agricultural Research and Cooperatives Extension. Penn State University 34. 2004. p55.
39. Kaiser, A; Piltz, J; Burns, H; Griffiths, N. Successful Silage. Dairy Research and Development Corporation and NSW Agriculture, Australia. 2003. Charter 13.
40. Kraiem K., Garrett J. E., Meiske J. C., Goodrich R. D. y Marten G. C. Influence of method of forage preservation on fibre and protein digestion in cattle given lucerne, birdsfoot trefoil and sainfoin. Anim. Prod. 1990. p221.

41. Kumar R., y Vaithyanathan S., Occurrence. Nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. Anim. Feed Sci. Technol. 1990 p21. Disponible en:
<http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080072016.PDF>. [Consultado el 19-10-11]
42. López Silva, A.A; Vega Norori, I. Guía Técnica De Cultivos De Cobertura Para Sistemas De Cultivos Perennes. G-N° 3. Nicaragua. 2004. p20.
43. Mellor Spare, Lynch Raphael; métodos de laboratorio, segunda edición, México D.F. 1977. P. 930.
44. Miles J.; Argel P. *Pasturas Tropicales*. El Germoplasma Mejorado De Forrajes. Ciat, (International Center For Tropical Agriculture). Costa Rica (Journal) Volumen 28, No. 3, 2006. Disponible en:
http://webapp.ciat.cgiar.org/improved_germplasm/germoplasma/forrajes.htm [Consulta el 23.5.2011]
45. Ministerio De Agricultura Y Ganadería. Diagnóstico De Los Recursos Zoogenéticos En El Salvador, Diciembre de 2003. Oficina De Políticas Y Estrategias, División De Análisis Estratégico. 2004 [Consulta: 1.5.2011] [En Línea].
46. Ministerio de agricultura y ganadería; Centro nacional de tecnología agropecuaria y forestal CENTA S – 3, Alto Rendimiento De Forraje. Programa Granos Básicos. San Andrés, La Libertad; El Salvador. 2002. p4.
47. Mundo Pecuario. Caracterización De *Vigna Sinensis*. (En Línea). 2007. Disponible En: <http://mundo-pecuario.com/tema192/leguminosas/Vigna-1078.html>. [Consulta el 24.4.2011].

48. Orellana Claros M. Determinación cuantitativa de taninos en extracto hidroalcohólico de hojas de *Fragaria vesca L.* (Fresa) por espectrofotometría ultravioleta [tesis doctoral]. El Salvador: Editorial Universidad de El Salvador; 2007.
49. Organización de las naciones unidas para la Agricultura y la alimentación. Manual de técnicas para laboratorio de nutrición. Depósito de documentos de la FAO. 1993. Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB489S/AB489S03.htm>. [Consultado el 19.10.2011]
50. Posada García, Selene Cleopatra, Valencia Minero Ana María. Determinación De Álcalis, Taninos Y Fenoles En Granos De Sorgo Para Seleccionar Materiales Que Puedan Utilizarse En Procesos De Nixtamalización. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. 1997.
51. Reed, J.D; Soller, H; Woodward, A. Fodder tree and straw diets for sheep: intake, growth, digestibility and the effects of phenolics on nitrogen utilization. Animal. Feed science and technology. 1990. p39 – 50. Disponible en: <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd16/2/oter1602.htm> [Consultado el 19-8-11]
52. Rodríguez Carías, Abner A. PH. D. Elide valencia chin, ph.d. Universidad de puerto rico, Ruminantia una publicación dirigida a productores de pequeños rumiantes en puerto rico vol: 3, no 2, 2007. Disponible en <http://www.uprm.edu/agricultura/inpe/ruminantia>[Consultado el 20.4.2011]

53. Rodriguez Urrutia, EA. Abonos Verdes Y Cultivos De Cobertura. Subcomponente De Conservación De Suelos Y Agroforestería. Primera Edición. Santa Ana, El Salvador. Mag, Care In. 2000. p18.
54. Rosales, Mauricio. Efectos asociativos in vitro de mezclas de forrajes arbóreos para rumiantes fundación cipav centro para la investigación en sistemas sostenibles de producción agropecuaria, Cali, Colombia. Disponible en:
<http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/afri/espanol/document/agrof99/rosales.htm>. [Consulta el 31.5.2011]
55. Sánchez, A. 2007 Leguminosas Como Potencial Forrajero En La alimentación bovina (en línea). Venezuela, Fonlap. Disponible en:
<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd50/leguminosas.htm>. [Consulta el 31.5.2011]
56. Steel G.D., Robert; Torrie H., James. Principles and procedures of statistics with special reference to the biological sciences. McGraw-Hill book company, INC. USA. 1960. p436 – 434
57. W. Robert Bailey PH. D, Elvyn G. Scott M.S M.T. Diagnostico microbiológico, aislamiento e identificación de microorganismos patógenos, editorial panamericana 1973. p37.
58. Wall, JS; Ross, WM. Producción y usos del sorgo. Bottaro, ao. The avi publishing inc. Primera edición. Buenos aires, argentina, editorial hemisferio sur. 1975. p399.

59. Wolfgang S. W. Alimentos complementarios para producción de carne. Cenerema uach. 2009. Disponible en:
<http://www.uach.com/publica/divulga/fd50/alimentos/generalidades.htm>
[Consultado el 15.5.2011]
60. Zavala Jerez, DE; López Hernandez, FM; Ventura Ventura, B. Efecto de la proteína cruda y la energía en la fertilidad de vacas lecheras en ocho ganaderías de El Salvador. Tesis ing. Agr. El salvador, San Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. 2005. p117.

GLOSARIO

Abomaso: Este cuarto y último compartimiento del estómago del pequeño rumiante es conocido también como cuajar y es el compartimiento gástrico que tiene un pH ácido y es equivalente al estómago que poseen los no rumiantes. El jugo gástrico es producido por células especializadas en la pared del abomaso y está compuesto por ácido clorhídrico (HCl), mucina (proteína que protege las paredes del estómago de la acidez). Gastrina (hormona) y enzimas digestivas (i.e pepsina y renina) ⁽⁵¹⁾

Aminoácido: Acido orgánico con uno o más grupos amino (NH_2^-) en lugar de átomos hidrogeno ⁽⁵⁾

Astringente: Dícese de lo que en contacto con la lengua produce en esta la sensación mixta entre sequedad intensa y el amargor, como esencialmente ciertas sales metálicas ⁽²⁹⁾

Bactericida:Agente capaz de provocar la muerte de las bacterias ⁽²⁹⁾

Bacteria Gram (+): Bacterias con un bajo contenido lipidico en la pared celular y que en presencia de un complejo coloreado violeta-yodo se tiñen de color purpura ⁽⁵⁶⁾

Bacterias Gram (-): Bacteria con un elevado contenido lipidico en la pared celular y que en presencia de un complejo coloreado violeta-yodo se tiñen de color rojo a rosado ⁽⁵⁶⁾

Concentrados: Alimentos que son pobres en celulosa y ricos en principios nutritivos digestibles totales. Técnicamente todos los alimentos que proporcionan principios nutritivos esenciales (proteínas, hidratos de carbono, grasas), se clasifican como concentrados cuando su contenido en celulosa es menos del 18%. ⁽³⁴⁾

Dormancia: Es un período en el ciclo biológico de un organismo en el que el crecimiento, desarrollo y, en los animales, la actividad física se suspende temporariamente. Esto reduce drásticamente la actividad metabólica permitiendo que el organismo conserve energía ⁽²⁷⁾

Ensilaje: Forraje conservado en estado succulento, mediante una fermentación parcial. ⁽³⁴⁾

Enzimas Proteolíticas:(Comúnmente llamadas proteasas), pertenecen al grupo de Hidrolasas, ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. ⁽³⁾

Fermentación Láctica: Proceso mediante el cual por medio de enzimas específicas se descomponen los carbohidratos en ácido acético y láctico y a menudo dióxido de carbono e hidrógeno ⁽⁴²⁾

Fenoles: Son un grupo de compuestos orgánicos que presentan en su estructura un grupo funcional hidroxilo unido a un radical arilo ⁽³⁵⁾

Fibra Neutra Detergente: Es la porción de la muestra de alimento que es insoluble en un detergente neutro (método de los detergentes de Van Soest). Está básicamente compuesta por celulosa, hemicelulosa, lignina y sílice, y se la denomina pared celular. La misma se correlaciona inversamente con el consumo voluntario de materia seca. ⁽⁸⁾

Fibra Acido Detergente: Es la porción de la muestra de alimento que es insoluble en un detergente ácido (método de los detergentes de Van Soest). Está básicamente compuesta por celulosa, lignina y sílice. La importancia de la misma radica en que está inversamente correlacionada con la digestibilidad del forraje. ⁽⁸⁾

Forraje: Alimento vegetal para los animales domésticos. Generalmente, este término se refiere únicamente a materiales como los pastos, heno, el ensilaje y los alimentos verdes. ⁽³⁴⁾

Ganado: Es el conjunto de animales domésticos que se apacientan y andan juntos. ⁽²⁹⁾

Granulometría: Rama de la sedimentología que estudia la forma y tamaño de los fragmentos de las rocas sedimentarias y los sedimentos. ⁽²⁹⁾

Glucocalix: Capa externa que recubre la membrana plasmática de muchas células vivas, formadas por glucoproteínas. ⁽²⁹⁾

Gramíneas: Botánicamente, cualquier especie de la familia *Gramineae*. Generalmente, en la agricultura a base de pastos, el término gramínea no comprende a los cereales cosechados para grano, pero comprende a veces especies de leguminosas producidas en asociación con las gramíneas. ⁽³⁴⁾

Hemicelulosa: Grupo complejo de hidratos de carbono, algo menos resistente a la digestión de la celulosa. ⁽³⁴⁾

Leguminosas: Es una especie miembro de la familia de leguminosa, que tiene la característica de formar nódulos de nitrógeno en sus raíces, lo que permite la utilización de nitrógeno atmosférico. ⁽³⁴⁾

Lignificar: Dar contextura de madera. Tomar consistencia de madera; en el proceso de desarrollo de muchas plantas, pasar de la consistencia herbácea a la leñosa. ⁽³⁴⁾

Lignina: Sustancia de protección de las membranas de las células de los tejidos de acción mecánica y de sostén de las plantas. ⁽²⁹⁾

Método Kjeldahl: Procedimiento para determinación Cuantitativa de nitrógeno en compuestos orgánicos, consistente en la reacción con ácido sulfúrico resultando sulfato de amónico. (29)

Monogástrico: Que solo tienen un solo vientre o estomago (49)

Monocotiledóneas: Plantas angiospermas que se caracterizan por poseer un solo cotiledón, son herbáceas con raíces fasciculadas, tallos huecos y fistulosos, hojas alargadas y palminervias, flores frecuentemente en espiga y frutos en cariósido o en cápsula. (29)

Nixtamalización: Del nshuatl nextri. Cenizas de cal y tamalli, masa de maíz cocida. Este proceso es una lixiviación alcalina en caliente en la que el área superficial para la transferencia de masa y calor es el factor limitante. Por ende, mientras mayor sea el área de transferencia, más eficaces serán los fenómenos de transporte de iones calcio e hidróxido y como consecuencia de estos fenómenos aumentaran las velocidades de las reacciones químicas (49)

Oligómero: Se define como un polímero de peso molecular muy inferior al de las macromoléculas. (29)

Palatabilidad: Calidad de un alimento de ser grato al paladar. (29)

Panoja: Llamada también panícula, es la inflorescencia de tipo racemosa, en la que los ramitos van creciendo de la base al ápice, por lo que toma aspecto piramidal (49)

Pienso: Porción de alimento seco que se le da al ganado (49)

Plántula: El embrión ya desarrollado como consecuencia de la germinación; plantita recién nacida. (49)

Proteínas: Combinación de aminoácidos, que se encuentran formando monómeros unidos por un enlace peptídico, formados por Carbono, Nitrógeno, Oxígeno e Hidrógeno. ⁽²⁹⁾

Polímero: Compuesto formado por el enlace químico de un número de moléculas de la misma clase, o de clases muy relacionadas. ⁽⁵⁾

Ración: Cantidad de un alimento o de una mezcla de alimentos suministrada en 24 h. y que constituye la dieta de un animal. ⁽³⁴⁾

Rumen: El primer compartimento del estómago de un rumiante o animal que rumia. ⁽³⁴⁾

Tamiz: Cedazo de malla tupida, usado para separar las partes menudas de las gruesas de una masa pulverulenta. ⁽²⁹⁾

ANEXOS

ANEXO N°1

TABLAS DE CARACTERISITICAS AGRONOMICAS DE LAS
VARIETADES DE SORGO (*Sorghum bicolor*)

Tabla N°5. Características agronómicas del sorgo (*sorghum bicolor*) de la variedad S – 2. ⁽⁴⁶⁾

CARACTERÍSTICAS	VALOR PROMEDIO
Altura de la planta	2.70 Mts
Días a flor	70 días
Días a cosecha de ensilaje	100 días
Días a cosecha de grano	75-80 días
Rendimiento de grano	50 qq / Mz
Rendimiento de forraje	50 Tm/Mz
Tipo de panoja	Semi compacta
Color del grano	Blanco
Color de la planta	Canela

Tabla N°6. Características agronómicas del sorgo (*sorghum bicolor*) de la variedad RCV.⁽⁴⁶⁾

CARACTERÍSTICAS	VALOR PROMEDIO
Altura de la planta	1.80 Mts
Días a flor	70 días
Días a cosecha	110 días
Rendimiento de grano	80 qq / Mz
Rendimiento de forraje	-----
Tipo de panoja	Semi compacta
Color del grano	Crema
Color de la planta	Canela

ANEXO N°2

MAPA DE UBICACIÓN GEOGRAFICA DEL ENSAYO



Figura N° 23. REPRESENTACIÓN AEREA DEL AREA DE TRABAJO (PARCELA EL VOLADOR).



Figura N° 24. UBICACIÓN DE LA COOPERATIVA ASTORIA, SAN PEDRO MASAHUAT, LA PAZ, EL SALVADOR

ANEXO N°3

ANALISIS BROMATOLOGICO PROXIMAL

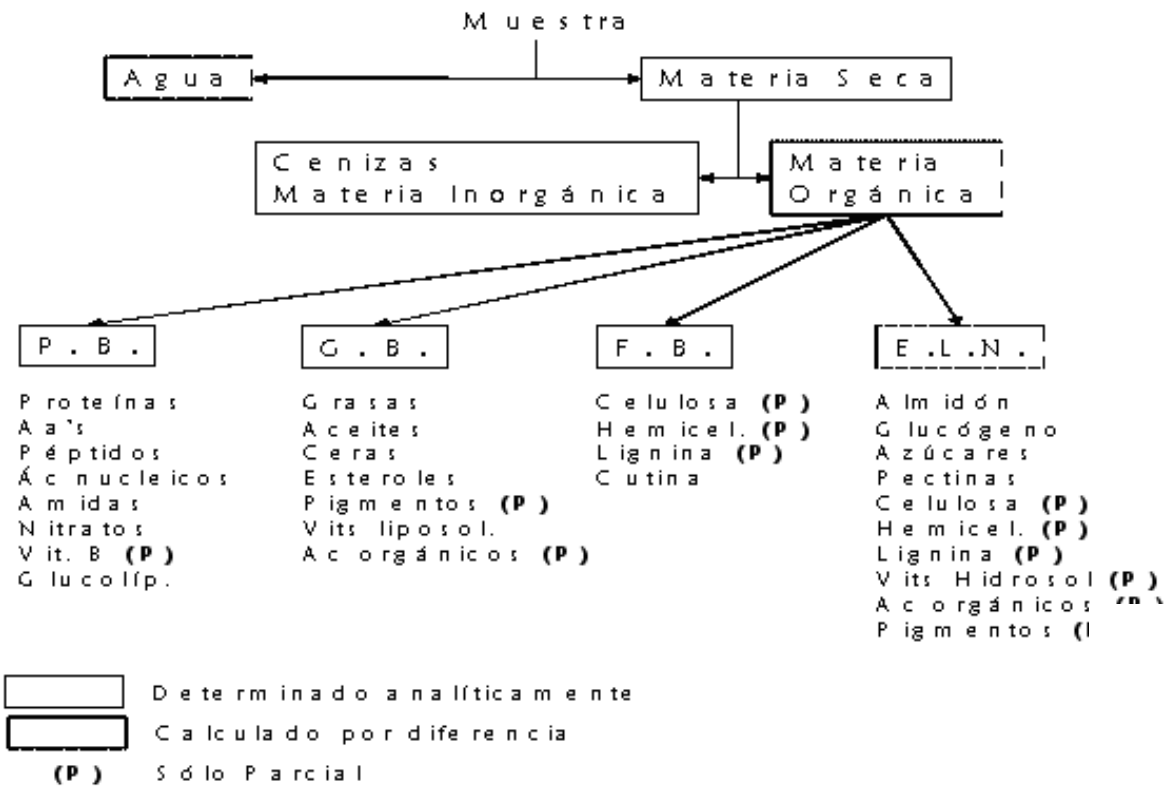


Figura N° 23. Esquema o secuencia del análisis bromatológico proximal o método de Wendee.

ANEXO N°4

EQUIPO, MATERIALES Y REACTIVOS PARA LOS ANALISIS DE
CUANTIFICACION DE TANINOS Y ANALISIS BROMATOLOGICO
PROXIMAL

Análisis para cuantificación de fenoles totales ⁽¹¹⁾

Material y equipo:

- Espectrofotómetro Ultravioleta Visible(Ver Anexo N°2)
- Balanza analítica
- Tubos de colorímetro
- Probeta de 25 mL
- Beakers de 50 mL, 100 mL, 150 mL, 250 mL, 400 mL, 600 mL y 1000 mL
- Micropipetas de 200 μ L, 500 μ L, 1000 μ L.
- Bureta de 25.0 mL

Reactivos

- Reactivo de Folin Ciocalteu 1 N.
- Carbonato de Sodio 20%
- Solución estándar de ácido tánico 0.1 mg/mL
- Agua destilada

Separación de taninos del extracto ⁽¹¹⁾

Material y equipo:

- Espectrofotómetro Ultravioleta Visible
- Balanza analítica

- Tubos de colorímetro
- Probeta de 25 mL
- Beakers de 50 mL, 100 mL, 150 mL, 250 mL, 400 mL, 600 mL y 1000 mL
- Micropipetas de 200 μ L, 500 μ L, 1000 μ L.
- Bureta de 25.0 mL

Reactivos

- Polivinilpirrolidona
- Agua destilada

Preparación de Reactivos para los Métodos de cuantificación de taninos ⁽¹⁴⁾

Método de Folin Ciocalteu

- Reactivo de Folin ciocalteu (1 N): Diluir el reactivo de Folin ciocalteu (2 N) que se encuentra comercialmente con un volumen igual de agua destilada. Transferir a un frasco color ámbar y almacenar en refrigeradora a 4 °C. No usar si el color se torna verde olivo.
- Carbonato de sodio (20%): Pesar 40 g de carbonato de sodio ($\times 10 \text{ H}_2\text{O}$), disolverlo en 150 mL de agua destilada y llevar a un volumen de 200.0 mL con agua destilada.
- Polivinilpirrolidona insoluble (PVPP): Se encuentra comercialmente como Sigma (P6755).

- Estándar de ácido tánico (0.1 mg/mL): Disolver 25.0 mg de ácido tánico en 25.0 mL de agua destilada y luego diluir 1:10 en agua destilada (usarse siempre como solución fresca).

Análisis para la determinación de Taninos Condensados

Método de Proantocianidinas (HCl-Butanol)

Materiales:

- Tubos de ensayo de 100 mm * 12 mm
- Beakers de 50, 100 mL
- Micropipetas de 100 µL
- Pipeta de 10.0 mL
- Agitador de vidrio
- Baño María a una T° de 97° - 100°C

Reactivos

- Reactivo HCl – Butanol (HCl – Butanol 5:95 v/v).
- Reactivo Férrico (Sulfato de amonio férrico 2% en HCl 2N)

Preparación de reactivos para el Método de Proantocianidinas (HCl – Butanol)

- Reactivo HCl – Butanol (Butanol – HCl 95:5 v/v): Mezclar 950 mL de n-butanol con 50 mL de HCl concentrado (37%).
- Reactivo férrico (sulfato amonio férrico 2% en HCl 2 N): Medir 16.6 mL de HCl concentrado en 100 mL de agua destilada para hacer HCl 2 N. Disolver 2.0 g

de sulfato amonio férrico en ese volumen de HCl 2 N. Este reactivo debe ser almacenado en frasco ámbar.

Analisis Bromatologico Proximal

Humedad Parcial (HP%)

Equipo:

- Estufa de vacío
- Balanza analítica
- Desecador de gabinete con desecante químico

Material:

- Bolsa de papel de 4 – 5 libras
- Espátula para pesar
- Tijeras de acero inoxidable
- Pinza tipo tijera de acero inoxidable
- Termómetro graduado de 0 – 150 °C
- Papel toalla

Humedad total (HT%)

Equipo:

- Estufa de vacío
- Balanza analítica

- Desecador de gabinete con desecante químico

Material:

- Caja de aluminio para humedad
- Pinza tipo tijera de acero inoxidable
- Termómetro graduado 0 – 150°C
- Espátula para pesar

Proteína Cruda (PC%)

Equipo:

- Aparato Microkjeldhal de digestión y destilación
- Balanza analítica y semi-analítica
- Cámara extractora de gases

Material:

- Tubos Tecator para proteína Kjeldahl de 250 mL
- Micro-Bureta de 10.0 mL y 25.0 mL
- Soporte para bureta completa
- Papel filtro o caja de aluminio para pesar la muestra
- Espátula para pesar
- Erlenmeyer de 250 mL

Reactivos:

- Ácido sulfúrico concentrado, libre de nitrógeno y densidad de 1.84
- Mezcla de catalizador: mezclar 7 g de Sulfato de potasio (pulverizado) y 0.8 g de Sulfato de cobre
- Solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N
- Solución de ácido bórico al 4%
- Solución indicadora de verde de bromocresol y rojo de metilo en metanol o alcohol etílico
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 40%
- Alcohol etílico al 95%

Extracto etéreo (EE%)

Equipo:

- Balanza analítica
- Desecador
- Aparato para extracción de grasas Soxhlet
- Dedal de extracción de Alundum o de cartón
- Recipientes de vidrio para sostener dedales
- Papel filtro y Algodón
- Pinza metálica tipo tijera
- Espátula para pesar

Reactivos:

- Éter de petróleo al 34 ó 35% o éter dietílico anhidro

Fibra Cruda (FC%)

Equipo:

- Extractor de Fibra Cruda
- Balanza analítica
- Desecador
- Estufa eléctrica
- Mufla
- Bomba para vacío

Material:

- Beakers Berzelius
- Crisol de Gooch de 25 mL
- Soporte Walter para crisol de Gooch
- Lienzo para filtración #40 aproximadamente de 20 cm²o tela
- Pinzas para beaker
- Frascos Kitasato de 250 ó 50 mL
- Embudos de vidrio boca ancha
- Espátula de acero inoxidable 1 litro capacidad

- Soportes de madera para embudos

- Probeta de 200 mL

- Beakers de vidrio de 100 mL

Reactivos:

- Solución ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.255 ± 0.005 N

- Disolver 1.25 g de ácido sulfúrico concentrado en 800 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL con agua destilada

- Solución NaOH 0.313 ± 0.005 N. Destilada y completar a 1000mL

- Alcohol metílico, etílico o isopropílico (Calidad Reactivo analítico)

- Indicador anaranjado metílico al 1% en alcohol etílico

- Indicador fenolftaleína al 1% en alcohol etílico

- Fibra de asbesto preparada: calentar en una cápsula de porcelana fibra de asbesto ácida a una temperatura de 600°C durante 16 horas. Enfriar y digerir media hora con solución de ácido sulfúrico 1.25%, lavar con agua caliente, digerir nuevamente media hora con solución de hidróxido de sodio 1.25%, lavar con agua, secar y calcinar durante 2 horas a 600°C en horno o mufla.

Cenizas (C%)

Equipo:

- Desecador

- Balanza analítica

- Mufla

Material:

- Cisoles de porcelana de 50 ó 100 mL
- Espátula para pesar de acero inoxidable
- Pinzas de metal para crisol
- Brocha para limpiar la balanza analítica

Fibra Neutro Detergente (FND)

Materiales:

- Beakers de berzeliuz de 600 ml.
- Cisoles de Gooch.
- Matraz kitazato
- Sistema de digestión para análisis de fibra.
- Estufa de vacio
- Mufia

Reactivos

- Lauril sulfato de sodio 30 g/L
- EDTA 18.61 g/L
- Fosfato de ácido disódico 4.56 g/L
- Borato de sodio 6.81 g/L

- Etilenglicolmonometiléter 10.0 ml/L

Preparación de Reactivos para Fibra Neutro Detergente (FND)

- Poner el EDTA y el borato de sodio en un beaker de 1000 ml, luego añadir un poco de agua destilada y calentar hasta disolver el contenido (solución 1). En otro beaker de 600 u 800 ml hacer una solución que contenga el lauril sulfato de sodio y el etilenglicol monometil éter (solución 2) y adicionar a la primera solución antes mencionada y mezclar (solución 2 en 1).
- En otro vaso de precipitado o beaker de 1000 ml poner el fosfato ácido disódico en un poco de agua destilada y calentar hasta disolverlo, esta mezcla se adiciona a las dos soluciones mezcladas anteriormente y luego se afora a un litro.

NOTA: es preciso revisar el pH de esta solución, el cual debe oscilar entre 6.9 y 7.1

Fibra Acido Detergente (FAD)

Materiales:

- Beakers de berzeliuz de 600 ml.
- Crisoles de Gooch.
- Matraz kitazato
- Sistema de digestión para análisis de fibra.
- Estufa de vacío
- Mufla

Reactivos

- Ácido sulfúrico 1N = 27.8 ml de H₂SO₄ concentrado/L
- Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB). = 20 g/L
- Acetona

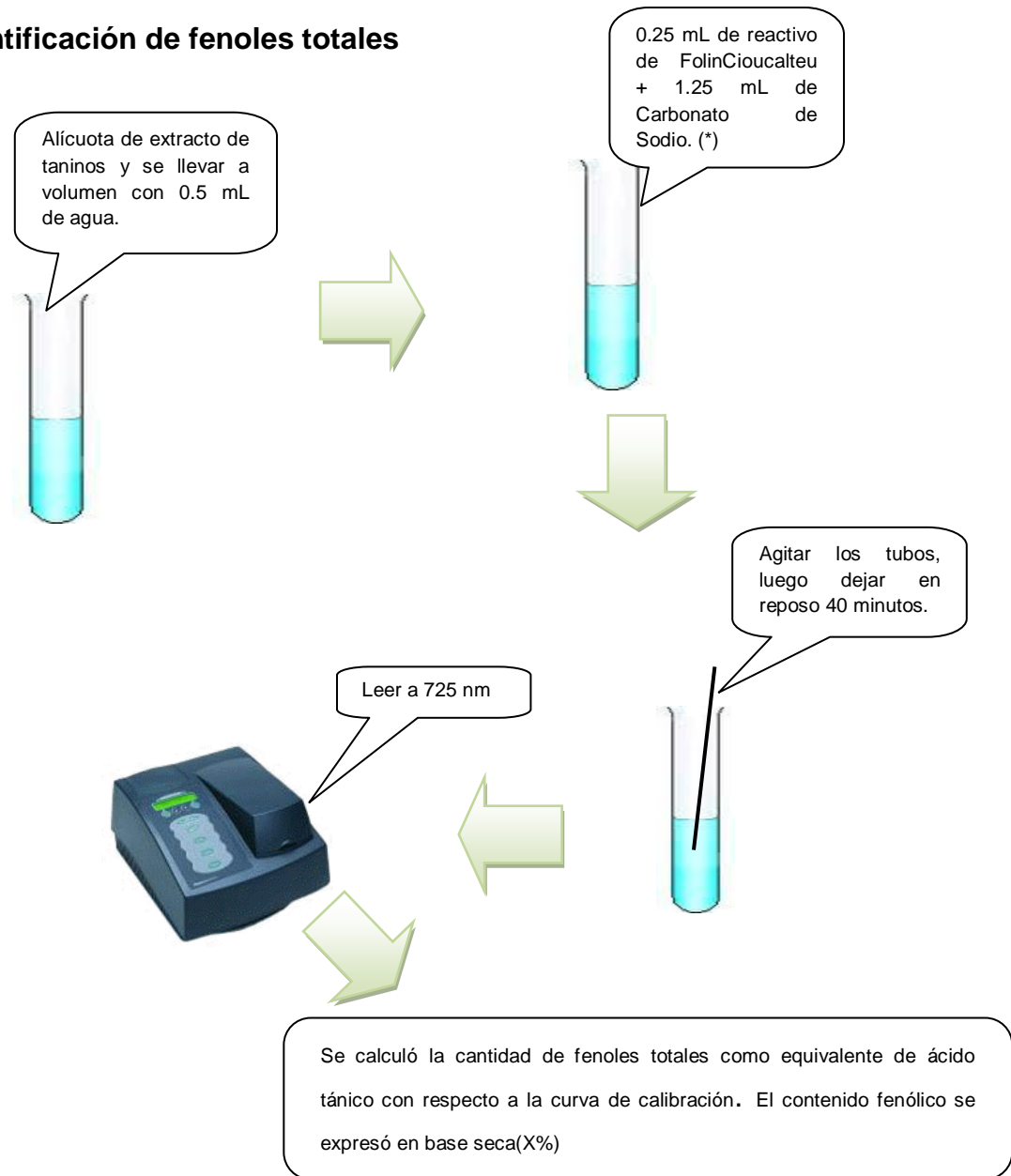
Preparación de Reactivos para Fibra Neutro Detergente (FND)

Diluir 27.8 ml de H₂SO₄ concentrado en un balón con un poco de agua destilada y llevar a 1 L. (esta es su solución 1 N). Luego disolver los 20 g de CTAB en el litro de H₂SO₄ 1 N.

ANEXO N°5

MARCHAS PARA LOS ANALISIS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE
TANINOS Y ANALISIS BROMATOLOGICO PROXIMAL

Cuantificación de fenoles totales



(*) Los volúmenes los aumentamos 5 veces, para poder tener volumen para cada lectura en el colorímetro spectronic 20

FIGURA N° 24: Esquema de cuantificación de fenoles totales por método de Folin ciocalteu

Procedimiento de arrastre de taninos con PVPP

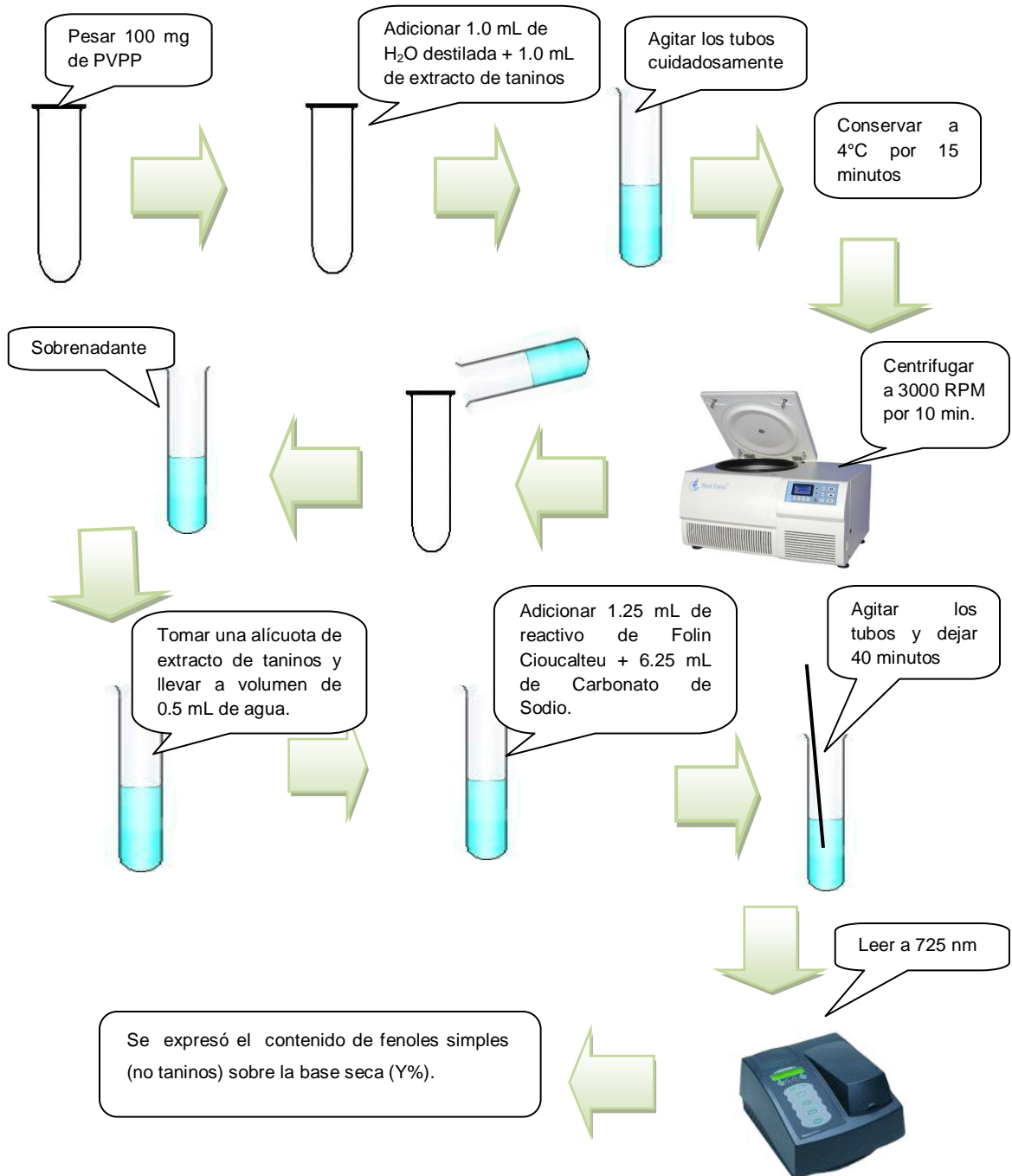


FIGURA N°25: Esquema de arrastre de taninos con PVPP

Procedimiento de cuantificación de taninos condensados por método de Proantocianidinas (HCl – Butanol)

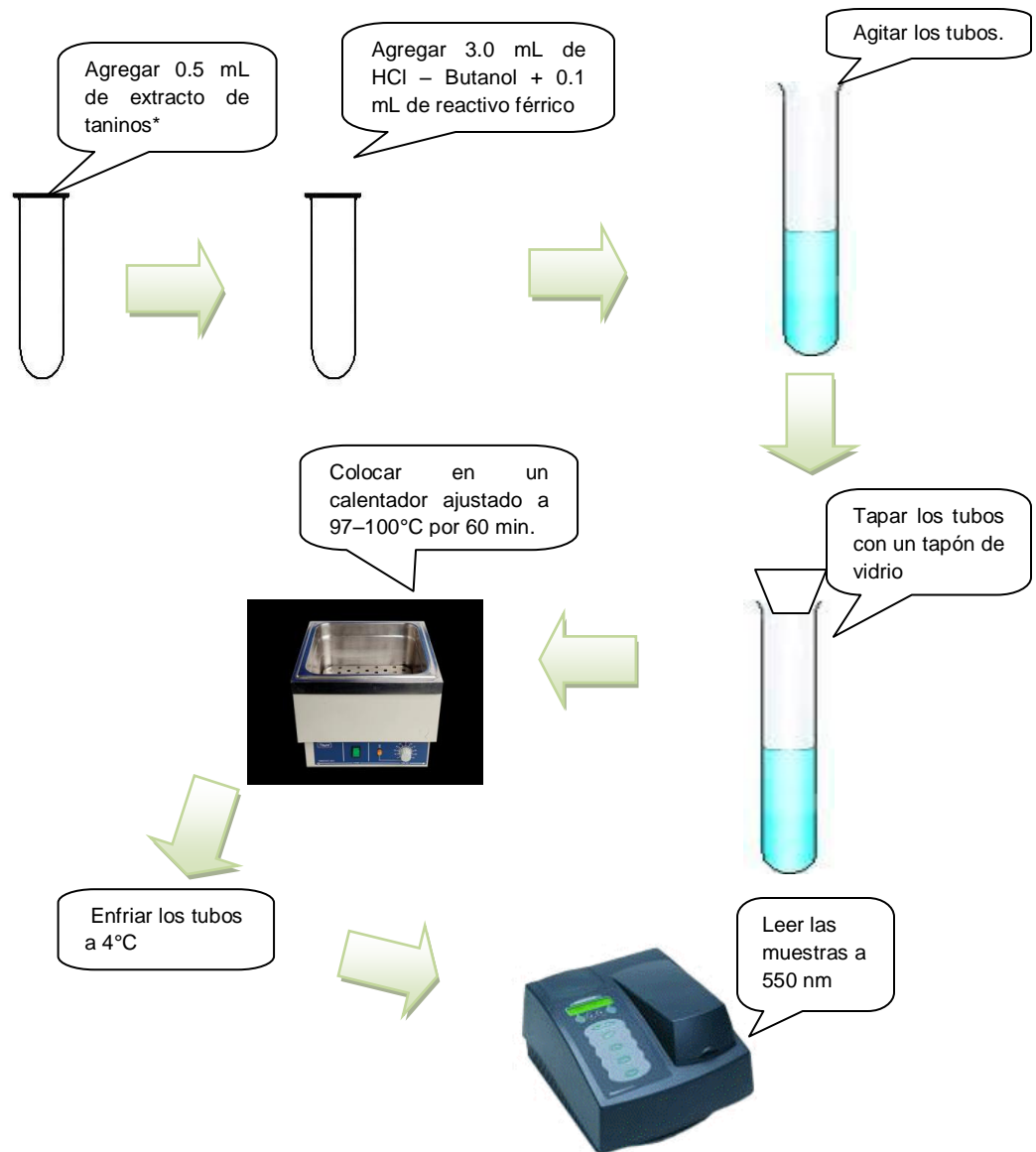


FIGURA N°26: esquema cuantificación de taninos condensados por método de proantocianidinas

Análisis Bromatológico Proximal o Método de Wendee

Procedimiento de Humedad parcial

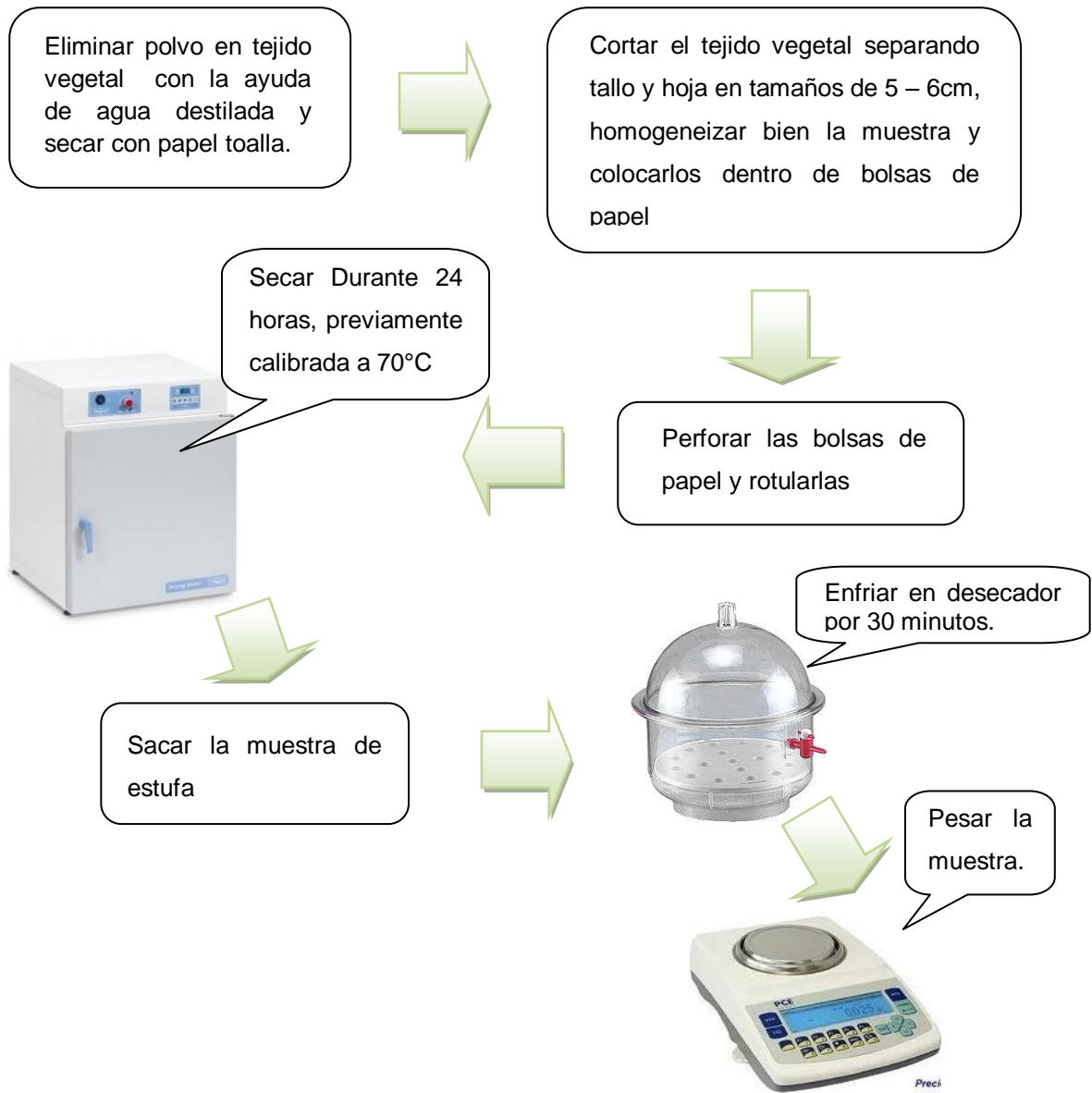


FIGURA N°27: Esquema de determinación de humedad parcial.

Procedimiento Humedad total

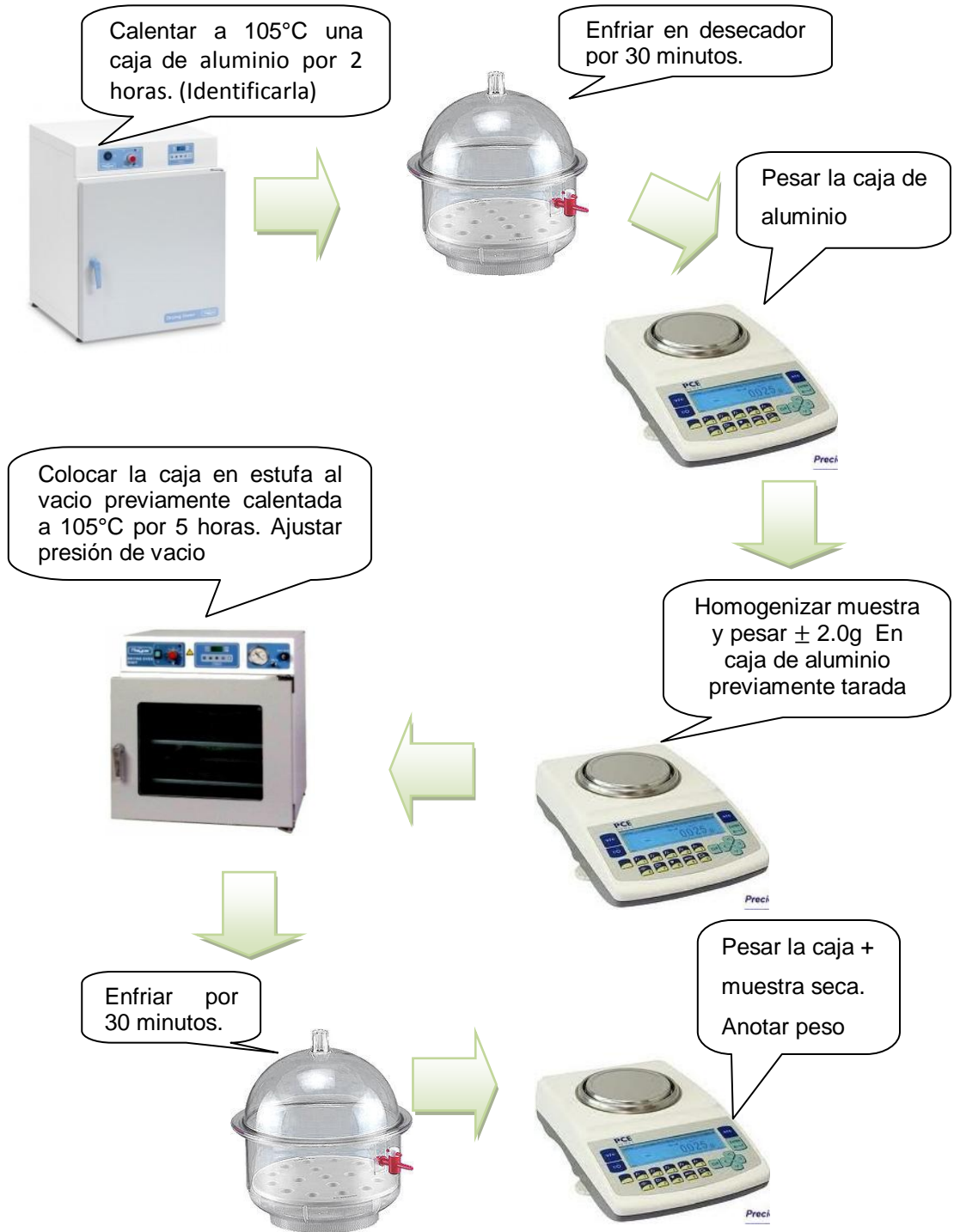


FIGURA Nº 28: Esquema de determinación de humedad total.

Procedimiento de proteína cruda

DIGESTION

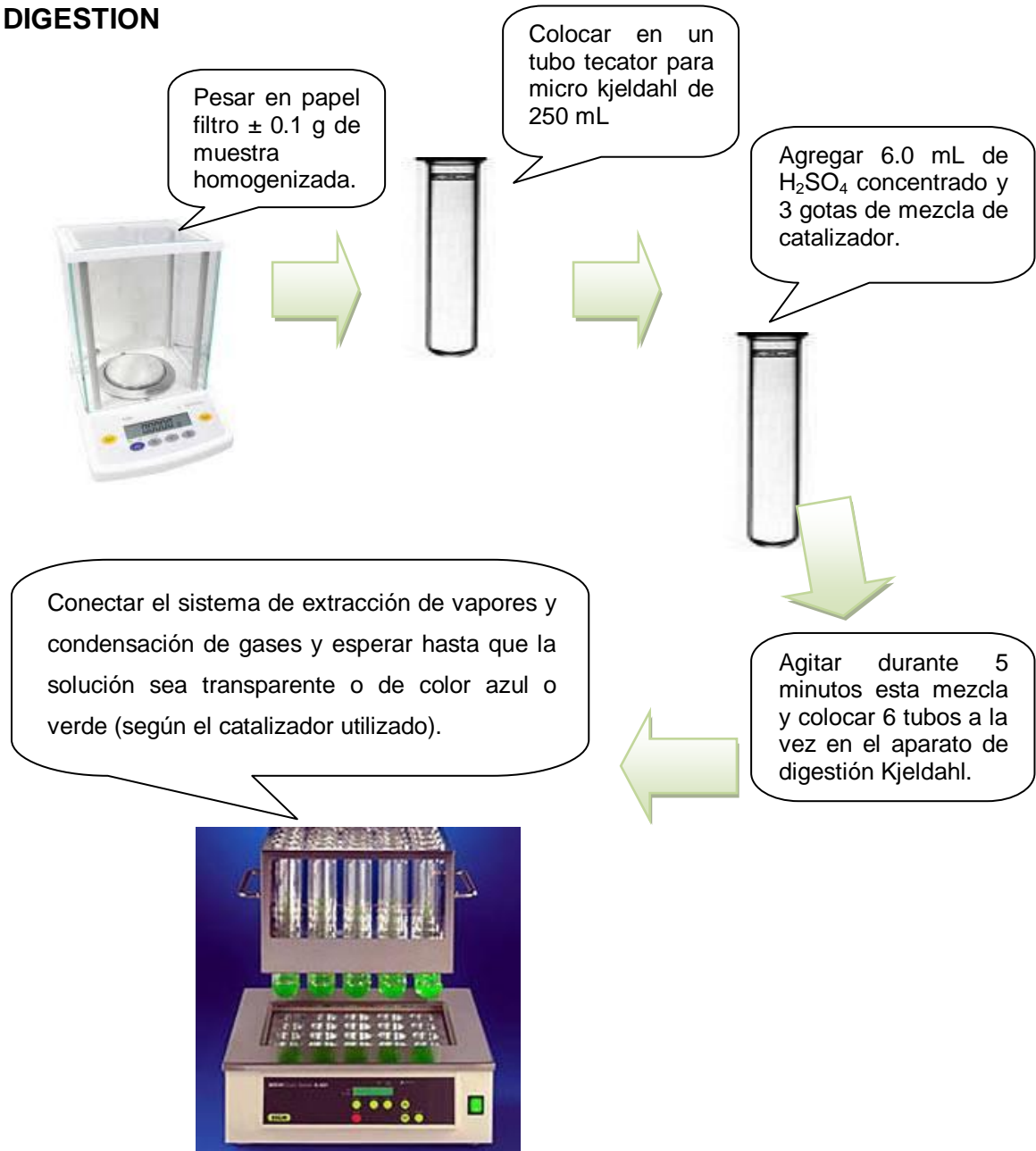
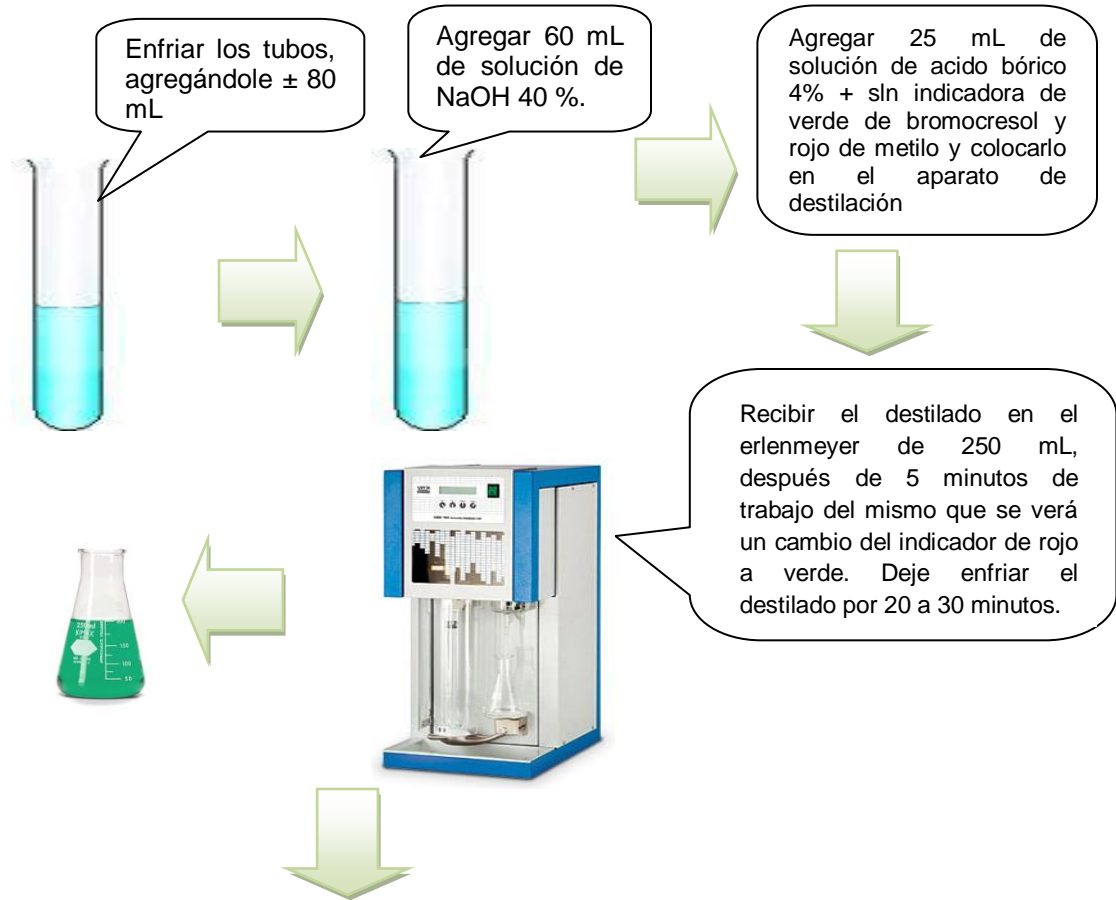


FIGURA N°29: Esquema de proceso de digestión en determinación de proteínas.

DESTILACION



TITULACION

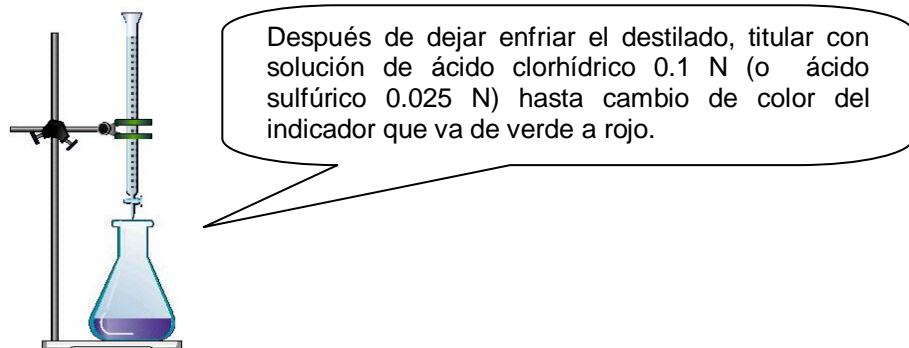


FIGURA N°30: Esquema de proceso de destilación y titulación en determinación de proteínas.

Procedimiento de Extracto etéreo

Pesa 2g de muestra en un papel filtro a la que se ha determinado el porcentaje de humedad y colocarlo en un dedal de extracción de grasas



Colocar dedal y muestra en el equipo de extracción, adicionar 150 mL de éter y cubrir uniformemente la muestra con algodón para distribuir mejor el éter



Tomar peso de balón vacío previamente tarado y colocarlo también en el sistema de extracción



Colocar en equipo de extracción de grasas conectar manguera correctamente y verificar que no haya fuga de éter, encender la llave del agua y aumentar la temperatura, refluja por 16 horas a una velocidad de dos gotas por segundo y verificar periódicamente que no haya fuga de éter.



Después de transcurridas las 16 horas retirar las muestras del dedal y almacenarlas para su posterior uso y depositar el residuo de éter en un depósito especial para éter usado y colocar nuevamente el dedal en el sistema de extracción para llevar a sequedad el éter que se encuentra en el balón donde se ha recolectado la grasa



Retirar los balones que contiene la grasa extraída del sistema y dejar que se evapore el éter completamente luego llevar a una estufa a 100° para secar completamente la muestra, enfriar y tomar el peso del balón con grasa.

Nota: tener especial cuidado con el uso del éter ya que este es sumamente volátil e inflamable, conservarlo a bajas temperatura y en frascos bien cerrados.



FIGURA N°31: Esquema de determinación de extracto etéreo.

Procedimiento de Fibra Cruda



Colocar la muestra desengrasada en un beaker de 600 mL que contenga 200 mL de ácido sulfúrico 1.25%



Pesar 0.5g de fibra de asbesto y colocarlos en el beaker que contiene la muestra



Colocar en equipo de digestión y dejar ebullición exactamente 30 minutos agitando periódicamente para evitar que la fibra se adhiera a las paredes



Después de 30 minutos retirar beaker y filtrar en contenido en tela lavando con agua hasta que el agua de lavado no tenga residuo de ácido, comprobando su ausencia con anaranjado de metilo



Con la ayuda de una espátula adecuada retirar el residuo de fibra de la tela y colocarlo nuevamente en el mismo beaker de 600mL y colocar 200 mL de NaOH 1.25% realizar el mismo procedimiento de la porción acida y comprobar la ausencia de NaOH con fenolftaleina como indicador.

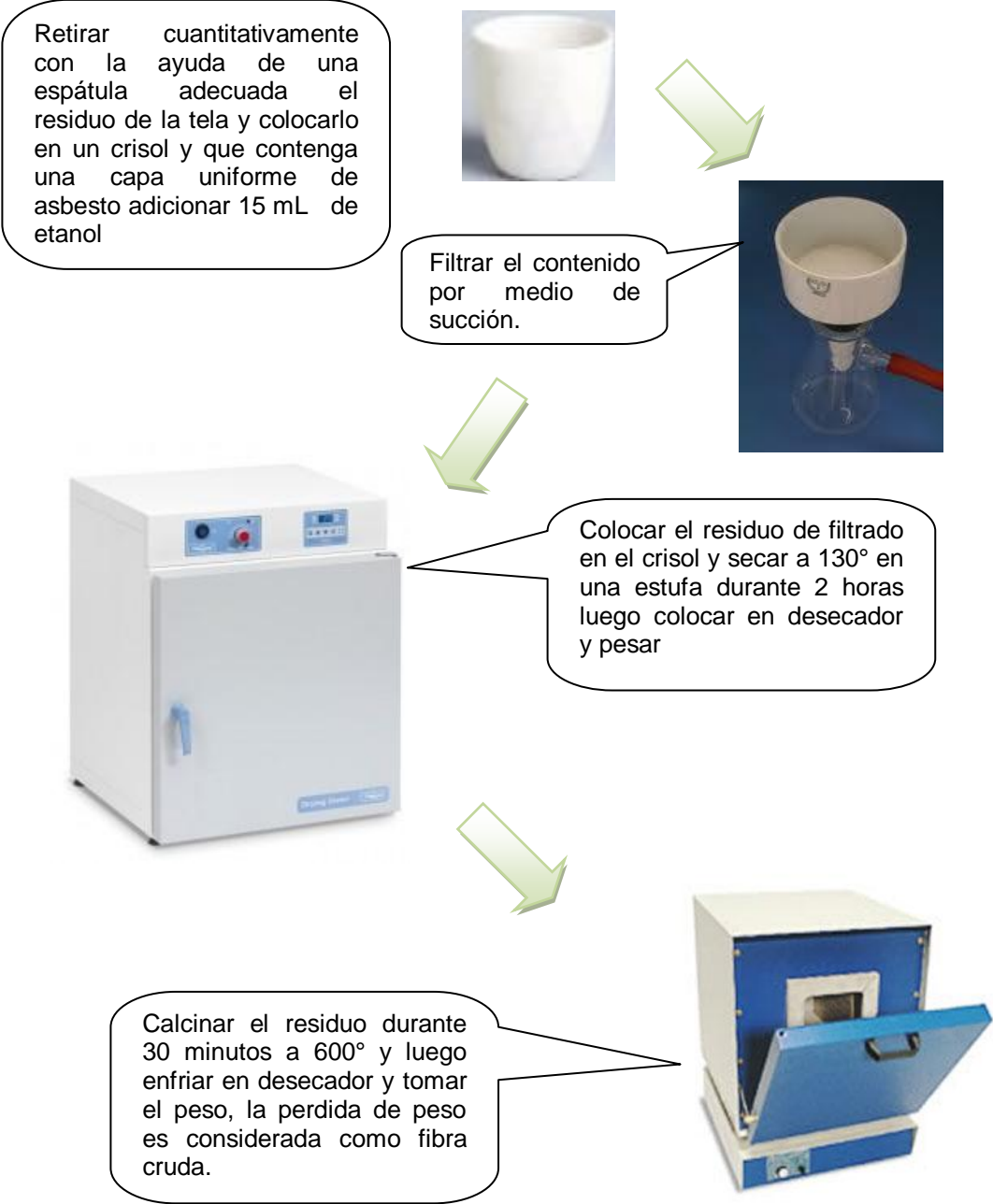


FIGURA N°32: Esquema de determinación de fibra cruda.

Procedimiento de minerales (Cenizas)

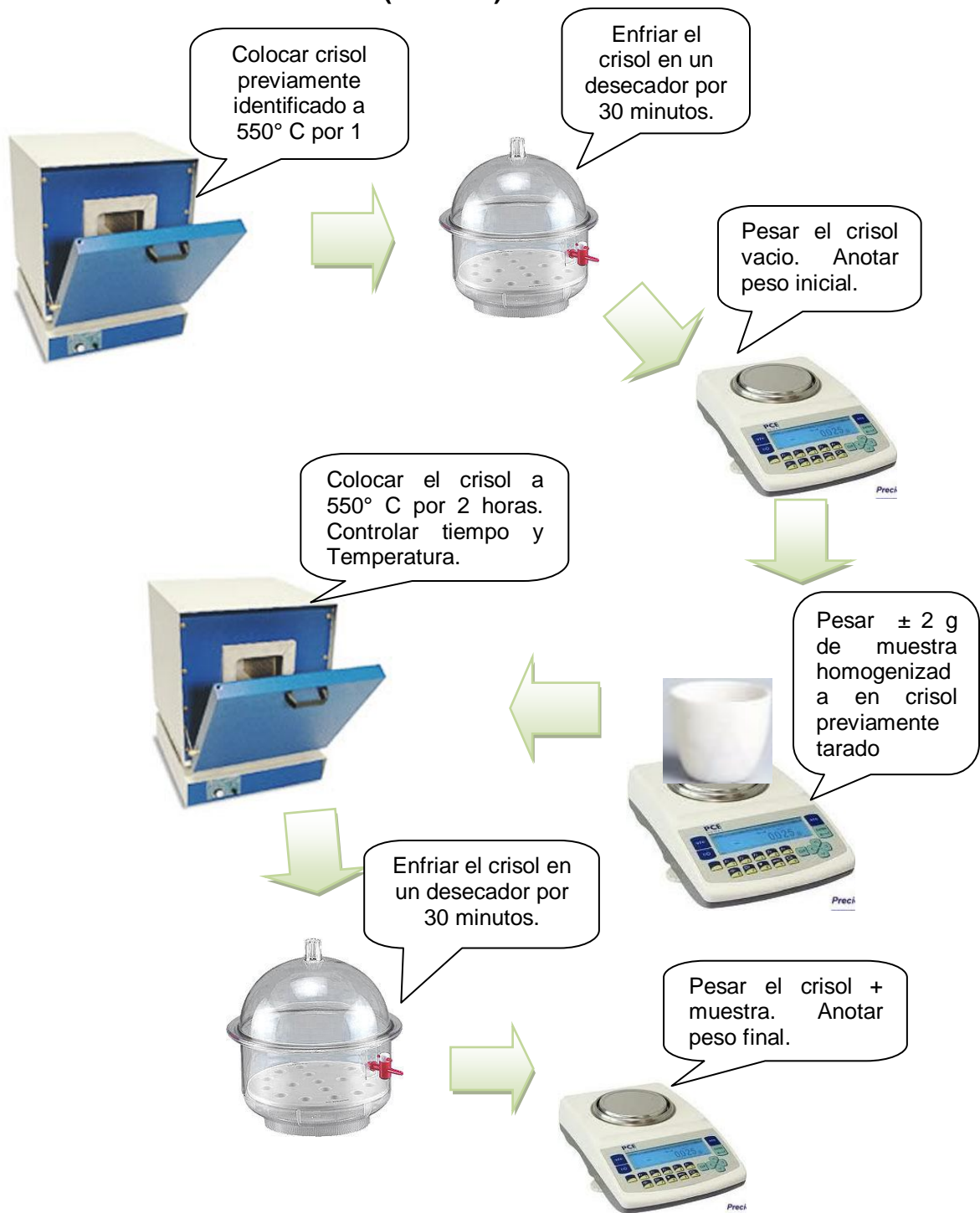


FIGURA N°33: Esquema de determinación de cenizas.

Análisis de Van Soest

Fibra Neutro Detergente (FND)



Pesar de 0.5g a 1g de muestra seca y molida



Colocar en beaker berzelius y añadir 100 mL de solución de FND por las paredes.



Colocar en equipo de digestión de fibra y llevarlo a ebullición luego disminuir la temperatura para evitar la formación de espuma



Después de transcurrida 1 hora de digestión, filtrar el contenido del beaker en un crisol de gooch previamente pesado, luego adicionar abundante agua destilada hirviendo varias veces hasta reducir la formación de espuma o grumo durante el filtrado al vacío



Lavar con acetona o etanol y colocar en la estufa a 100° durante 16 horas o toda la noche luego enfriar en desecador y pesar el crisol.

FIGURA N° 34: Esquema de determinación de fibra neutro detergente.

Fibra Acido Detergente (FAD)

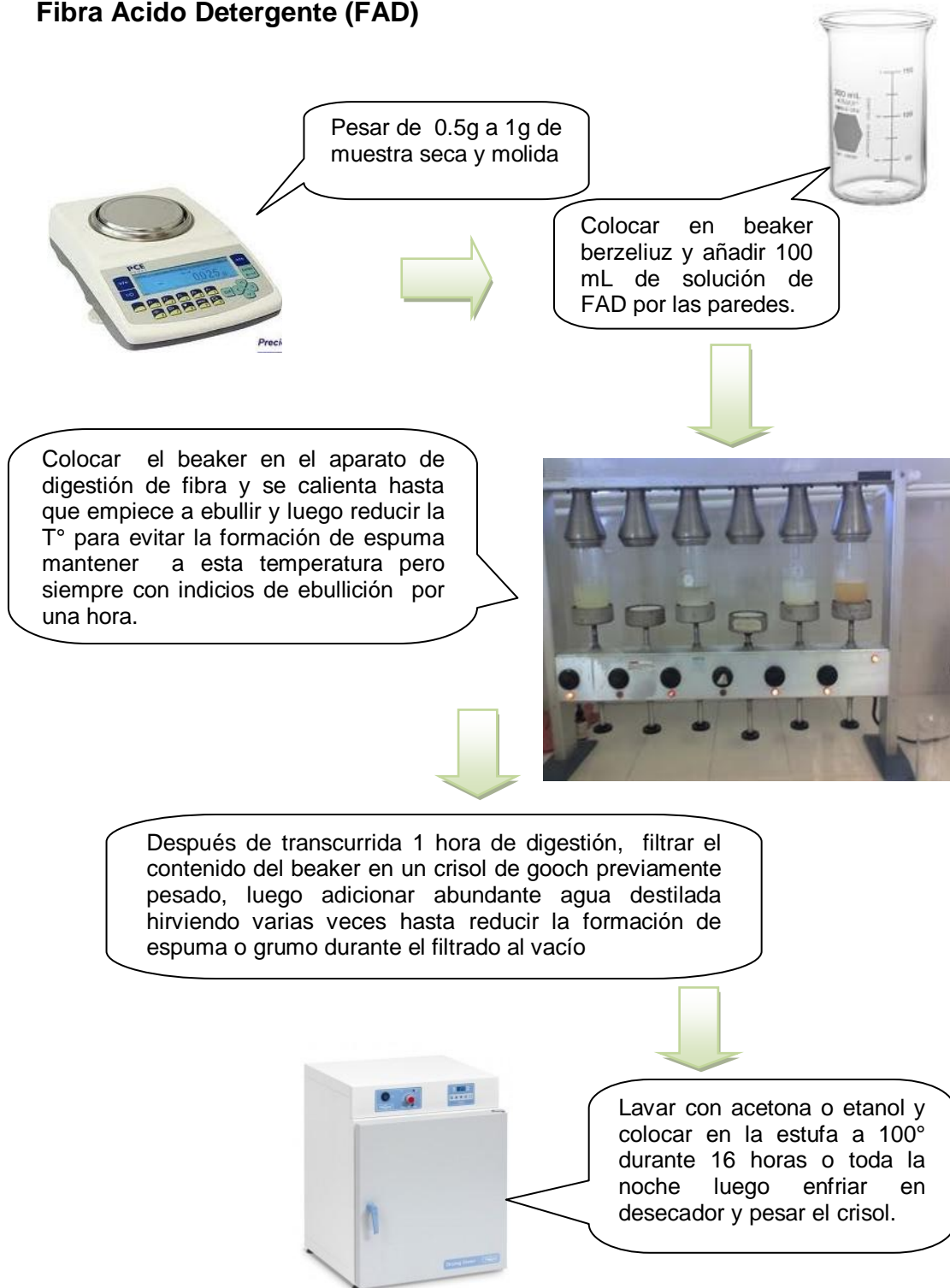


FIGURA Nº 35: Esquema de determinación de fibra acido detergente.

ANEXO N° 6

CUADRO DE RESULTADOS DE CUANTIFICACION DE TANINOS POR
DOS METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS Y ANALISIS
BROMATOLOGICO PROXIMAL

CUADRO N° 5 Resultados de porcentajes promedio de cuantificación de taninos totales, taninos condensados y análisis bromatológico proximal: Método de Wendee y Método de Van Soest en las diferentes mezclas y proporciones a base de dos leguminosas y una gramínea.

Mezcla	Proporción	MS%	PC%	EE%	FC%	CENIZA %	ELN%	FND%	FAD%	Taninos totales %	TC%
S-2 + C	50 : 50	21.52	12.69	2.9	25.09	9.64	49.68	62.63	42.32	0.272	0.094
	60 : 40	22.16	10.82	2.4	25.67	9.66	51.45	60.02	40.71	0.991	0.134
	70 : 30	23.01	10.95	3.4	26.08	9.57	50.00	57.14	37.79	1.299	0.152
	80 : 20	22.04	9.99	3.3	27.18	8.82	50.71	61.75	39.1	1.457	0.163
S-2 + V	50 : 50	18.78	11.6	2.8	24.33	9.79	51.48	60.88	42.41	1.081	0.162
	60 : 40	20.2	10.21	2.2	25.67	8.58	53.34	61.81	41.44	1.328	0.163
	70 : 30	20.58	9.73	2	26.18	8.99	53.10	61.1	40.42	2.025	0.197
	80 : 20	21.67	8.91	1.9	27.56	8.27	53.36	61.11	37.88	3.055	0.198
RCV + C	50 : 50	21.18	13.31	2.4	22.45	8.46	53.38	57.78	40.34	0.530	0.133
	60 : 40	23.41	12.77	2.2	25.34	8.91	50.78	55.06	37.69	0.848	0.167
	70 : 30	23.38	10.81	3.8	26.38	7.88	51.13	56.07	37.62	1.045	0.170
	80 : 20	23.38	9.99	4.4	27.76	7.75	50.10	54.51	37.03	1.615	0.174
RCV + V	50 : 50	20.44	13.82	3.1	24.23	9.71	49.14	54.3	34.68	0.603	0.128
	60 : 40	20.81	10.49	3.2	25.45	8.4	52.46	55.24	35.91	0.821	0.172
	70 : 30	20.07	9.94	2.2	26.07	8.42	53.37	55.87	35.28	1.317	0.184
	80 : 20	20.44	9.77	2.9	27.12	8.13	52.08	55.72	33.47	1.523	0.202

ANEXO N° 7

DATOS TEORICOS PARA OBTENER CURVA DE CALIBRACION ESTÁNDAR DE ACIDO TANICO

Tabla N° 9. Preparación de curva estándar de Acido Tánico ⁽³²⁾

TUBO	SOLUCION DE ACIDO TANICO (0.1 mg/mL) mL	AGUA DESTILADA mL	REACTIVO DE FOLIN CIOCALTEU mL	SOLUCION DE CARBONATO DE SODIO mL	ABSORBANCIA 725 NM	ACIDO TANICO µg
BLANCO	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000	0
1	0.02	0.48	0.25	1.25	0.112	2
2	0.04	0.46	0.25	1.25	0.218	4
3	0.06	0.44	0.25	1.25	0.327	6
4	0.08	0.42	0.25	1.25	0.432	8
5	0.10	0.40	0.25	1.25	0.538	10

NOTA: En la parte experimental de esta investigación, aumentamos el volumen de reactivos con el propósito de obtener un mayor volumen final para poder realizar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 725 nm.

ANEXO N°8

CUADROS DE CURVAS DE CALIBRACION

Cuadro N° 5. Absorbancias de la curva de calibración de Acido Tánico 0.1 mg/mL

	18-05-11	21-05-11	04-06-11	27-08-11	PROMEDIO
Blanco	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.02	0.112	0.109	0.116	0.098	0.108
0.04	0.203	0.206	0.213	0.201	0.205
0.06	0.310	0.322	0.356	0.299	0.321
0.08	0.433	0.410	0.407	0.390	0.400
0.10	0.503	0.502	0.505	0.497	0.501

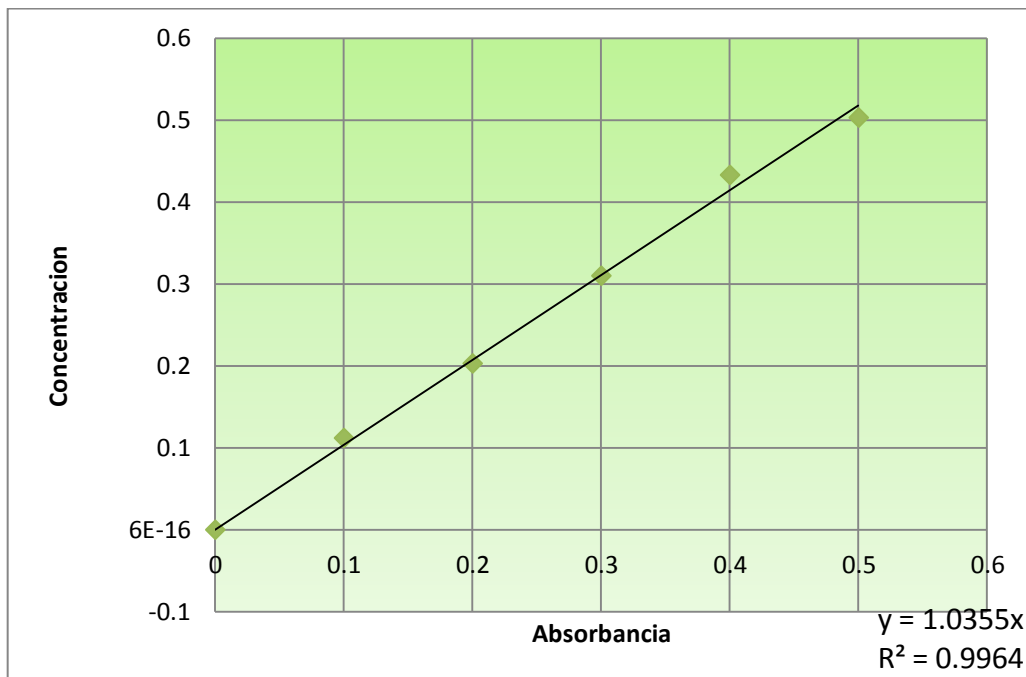


Figura N° 26. Curva de calibración estándar de ácido tánico N° 1 tomada el 18/05/11

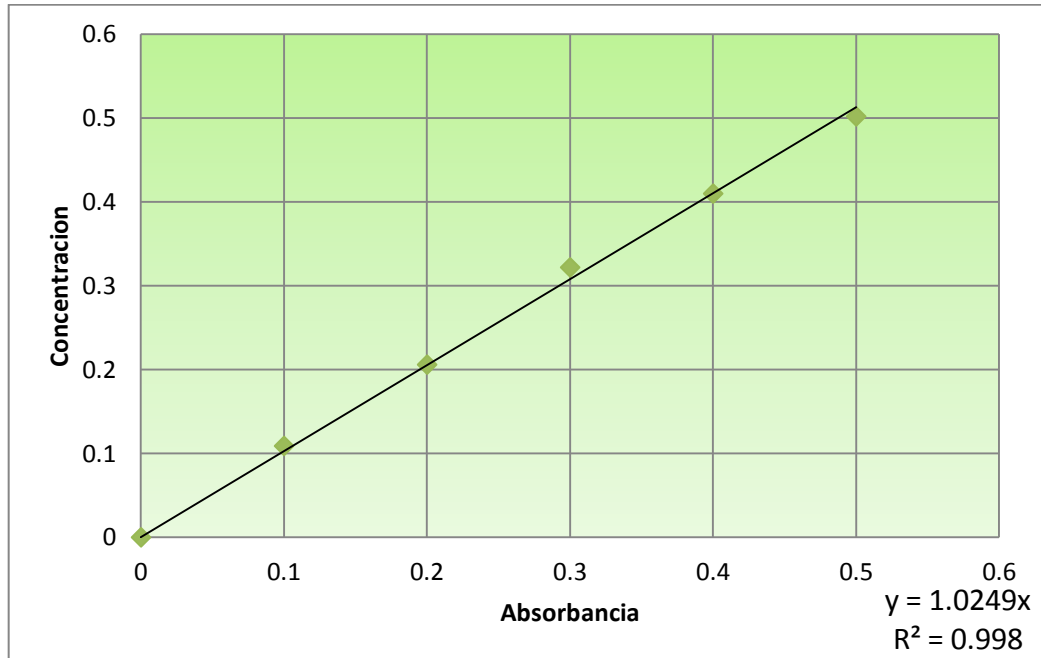


Figura N°27. Curva de calibración estándar de Acido Tánico N°2 tomada el 21/05/11

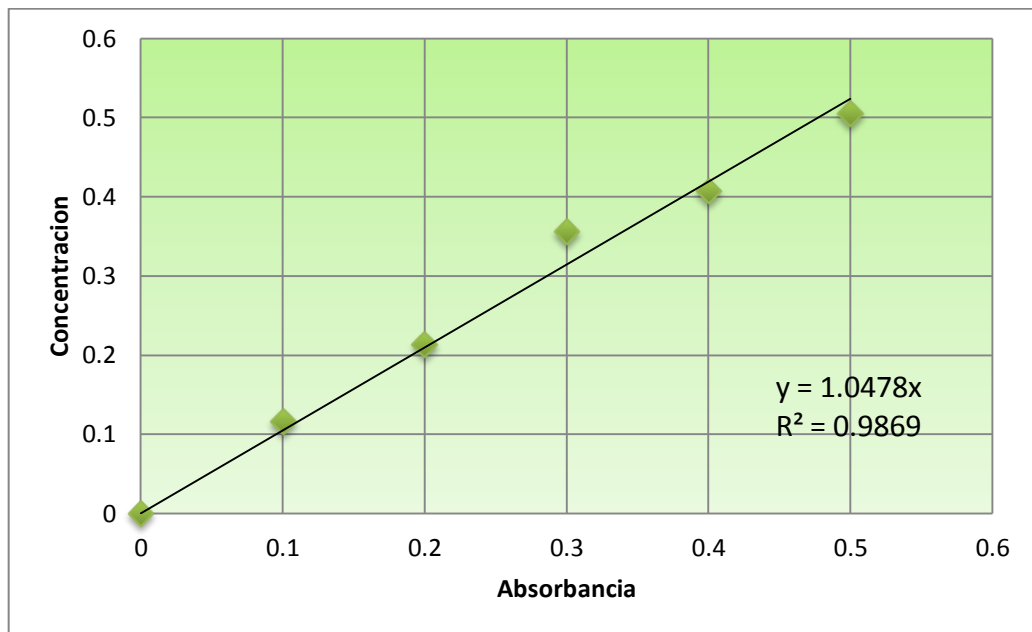


Figura N°28. Curva de calibración estándar de ácido tánico N° 3 tomada el 04/06/11

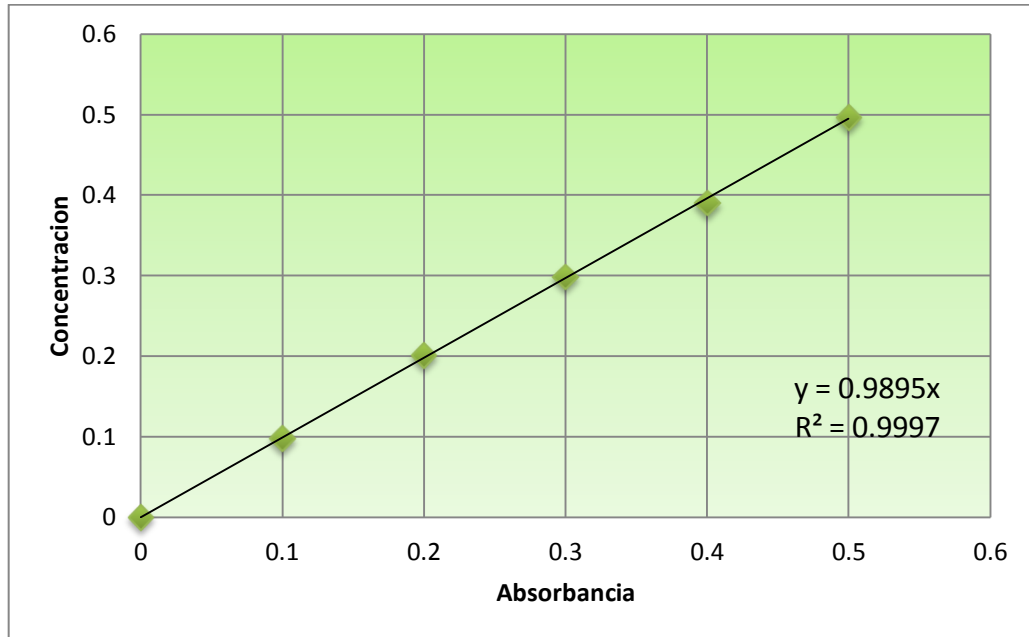


Figura N° 29. Curva de calibración estándar de ácido tánico N° 4 tomada el 27/08/11

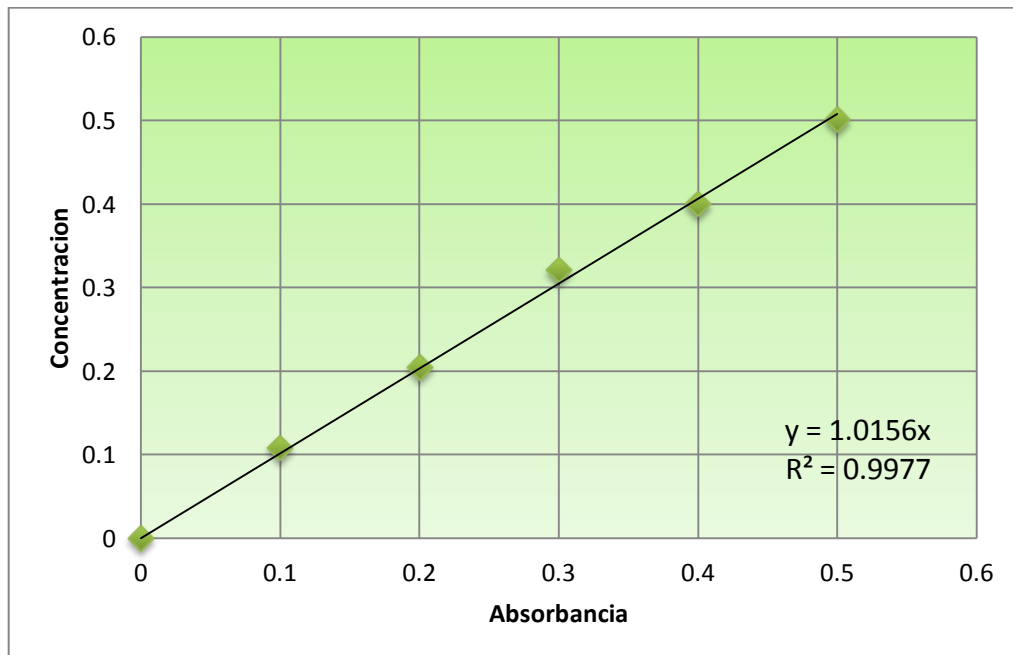


Figura N° 30. Curva promedio de calibración estándar de ácido tánico.

ANEXO N° 9

TABLAS PROMEDIO DE CUANTIFICACION DE TANINOS POR DOS
METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS DE MICROENSILADOS
ELABORADOS A BASE DE UNA GRAMINEA SORGO (*Sorghum
bicolor*) Y DOS LEGUMINOSAS FRIJOL ESPADA/CANCAVALIA
(*Canavalia ensiformis*) Y FRIJOL MONO (*Vigna sinensis*)

Tabla N° 5. Absorbancias promedio obtenidas en la cuantificación de taninos totales por (Folin Ciocalteu - PVPP) en las mezclas de forrajes a base de una gramínea (*Sorghum bicolor*) y dos leguminosas (*Canavalia ensiformis*) y (*Vigna sinensis*)

Mezcla	Proporción	PROMEDIO	
		0.25	0.5
S-2 + C	50 – 50	0.257	0.227
	60 – 40	0.419	0.264
	70 – 30	0.4	0.306
	80 - 20	0.49	0.370
S-2 + V	50 – 50	0.274	0.179
	60 – 40	0.437	0.324
	70 – 30	0.43	0.227
	80 - 20	0.436	0.222
RCV+C	50 – 50	0.367	0.294
	60 – 40	0.433	0.250
	70 – 30	0.439	0.339
	80 - 20	0.389	0.271
RCV+V	50 – 50	0.356	0.255
	60 – 40	0.419	0.267
	70 – 30	0.393	0.241
	80 - 20	0.398	0.332



Promedio de datos de FolinCiocalteu con alícuota tomada de 0.25 mL



Promedio de datos de PVPP con alícuota tomada de 0.5 mL

Tabla N° 6. Absorbancias promedio obtenidas en la cuantificación de taninos condensados por proantocianidinas (HCl – Butanol) en las mezclas de forrajes.

Mezcla	Proporción	PROMEDIO
S-2 + C	50 – 50	0.026
	60 – 40	0.038
	70 – 30	0.048
	80 - 20	0.043
S-2 + V	50 – 50	0.039
	60 – 40	0.051
	70 – 30	0.052
	80 - 20	0.045
RCV+C	50 – 50	0.036
	60 – 40	0.052
	70 – 30	0.050
	80 - 20	0.051
RCV+V	50 – 50	0.053
	60 – 40	0.049
	70 – 30	0.033
	80 - 20	0.045

ANEXO N° 10

EJEMPLOS DE LA REALIZACION DE CALCULOS PARA LA
CUANTIFICACION DE TANINOS POR DOS METODOS
ESPECTROFOTOMETRICOS, ANALISIS BROMATOLOGICO
PROXIMAL Y ANALISIS ESTADISTICO DE LAS MUESTRAS DE
FORRAJES A BASE DE UNA GRAMINEA SORGO (***Sorghum bicolor***) Y
DOS LEGUMINOSAS FRIJOL ESPADA/CANAVALIA
(***Canavaliaensiformis***) Y FRIJOL MONO (***Vignasinensis***)

Cuantificación de taninos totales por método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu con alícuota tomada de 0.1 mL para reactivo de Folin Ciocalteu y 0.25 mL para reactivo de PVPP*

Con Folin Ciocalteu:

50 μ L de extracto de taninos contiene 0.120 de absorbancia que equivalen a:

0.108 ——— 2**

0.120 ——— X = 2.22 μ g de ácido tánico (equivalente de la curva estándar)

Por lo tanto, 1 mL de extracto tiene $2.22/0.05 = 44.44$ μ g de TA

44.44 μ g de TA = 0.044 mg de TA

200 mg de muestra seca fueron extraídos con 10 mL de acetona al 70%.

Por lo tanto, 100 mg de muestra seca tiene $0.044 * 5 = 0.2222$ mg de TA.

Si la muestra contiene 21.52% de MS,

TA en MS = $0.2222/0.2152 = 1.033\% = X$

Con PVPP:

100 μ L de sobrenadante tratado con PVPP tiene 0.109 de absorbancia que equivalen a:

0.108 ——— 2

0.109 ——— X = 2.02 μ g de ácido tánico (equivalente de la curva estándar)

Por lo tanto, 1 mL de sobrenadante tiene $2.02/0.1 = 20.2$ μ g de TA

20.2 μ g de TA = 0.0202 mg de TA

200 mg de muestra seca fueron extraídos con 10 mL de acetona al 70%.

Por lo tanto, 100 mg de muestra seca tiene $0.0202 * 10 = 0.202$ mg de TA.

Si la muestra contiene 21.52% de MS,

TA en MS = $0.202/0.2152 = 0.938\% = Y$

Taninos (equivalente de ácido tánico) = $1.033 - 0.939 = 0.094\%$ en base seca.

*De la misma manera se hace con la alícuota tomada de 0.2 mL para reactivo de Folin Ciocalteu y 0.5 mL para reactivo de PVPP.

**NOTA: La concentración de 2 µg de ácido tánico son de la preparación de la curva estándar de ácido tánico. (Ver anexo N° 7)

Cuantificación de taninos totales por método espectrofotométrico de Proantocianidinas (HCl-Butanol)

Con la fórmula que se trabaja para el cálculo de los taninos condensados es: (A 550 nm x 78.26 x factor de dilución*) (%MS)

Absorbancia obtenida = 0.026

Tenemos que:

$(0.120 * 78.26 * 0.5) (21.52\%) = 0.094$

Análisis estadístico

El análisis estadístico para la cuantificación de taninos en alícuotas tomadas de prueba obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla N°7. Tabla resumen de promedios de concentración de taninos para las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones

	50-50	60-40	70-30	80-20	Σ	Σ^2	Promedio
S - 2 + C	0.272	0.991	1.299	1.457	4.019	16.15	1.0048
S - 2 + V	1.081	1.328	2.025	3.055	7.489	56.09	1.8723
RCV + C	0.530	0.848	1.045	1.615	4.038	16.31	1.0095
RCV + V	0.603	0.821	1.317	1.523	4.264	18.19	1.0660
				TOTAL	19.81	106.74	

Tabla N° 8. Resultados de suma de cuadrados (SC)

	RESULTADOS
FC	24.5273
SC_{TOTAL}	6.4867
SC_{TRATAMIENTO}	2.1539
SC_{ERROR}	4.3328

Análisis de varianza

Tabla N°9. Análisis de varianza para la concentración de taninos en las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones.

	GL	SC	CM	F_{CALCULADO}	F_{TABLA}
TRATAMIENTO	3	2.1539	0.7180	1.99	3.41
ERROR	12	4.3328	0.3611		
TOTAL	15				

El análisis estadístico para la cuantificación de taninos condensados por el método de proantocianidinas (HCl-Butanol).

Tabla N° 10. Tabla resumen de promedios de concentración de taninos condensados para las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones

	50-50	60-40	70-30	80-20	Σ	Σ^2	Promedio
S - 2 + C	0.094	0.134	0.152	0.163	0.543	0.29	0.1358
S - 2 + V	0.162	0.163	0.197	0.198	0.720	0.52	0.1800
RCV + C	0.133	0.167	0.170	0.174	0.644	0.415	0.1610
RCV + V	0.128	0.172	0.184	0.202	0.686	0.47	0.1715
				TOTAL	2.593	1.69	

Tabla N° 11. Resultados de suma de cuadrados (SC)

	RESULTADOS
FC	0.4202
SC_{TOTAL}	0.0125
SC_{TRATAMIENTO}	0.0045
SC_{ERROR}	0.0080

Análisis de varianza

Tabla N° 12. Análisis de varianza para la concentración de taninos condensados en las mezclas de forrajes en sus diferentes proporciones

	GL	SC	CM	F_{CALCULADO}	F_{TABLA}
TRATAMIENTO	3	0.0045	0.0015	2.14	3.41
ERROR	12	0.0080	0.0007		
TOTAL	15				

ANEXO N°11

TABLAS ESTADISTICAS DE DISTRIBUCION F

TABLAS DE DISTRIBUCION F

$\alpha =$	grados de libertad del numerador													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100	1000
1	161.45	199.5	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	248.02	252.2	253.04	254.3
2	18.513	19	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.446	19.479	19.486	19.496
3	10.128	9.5521	9.2766	9.1172	9.0134	8.9407	8.8867	8.8452	8.8123	8.7855	8.6602	8.572	8.5539	8.5267
4	7.7086	6.9443	6.5914	6.3882	6.2561	6.1631	6.0942	6.041	5.9988	5.9644	5.8025	5.6878	5.664	5.6284
5	6.6079	5.7861	5.4094	5.1922	5.0503	4.9503	4.8759	4.8183	4.7725	4.7351	4.5581	4.4314	4.4051	4.3654
6	5.9874	5.1432	4.7571	4.5337	4.3874	4.2839	4.2067	4.1468	4.099	4.06	3.8742	3.7398	3.7117	3.6693
7	5.5915	4.7374	4.3468	4.1203	3.9715	3.866	3.7871	3.7257	3.6767	3.6365	3.4445	3.3043	3.2749	3.2302
8	5.3176	4.459	4.0662	3.8379	3.6875	3.5806	3.5005	3.4381	3.3881	3.3472	3.1503	3.0053	2.9747	2.9281
9	5.1174	4.2565	3.8625	3.6331	3.4817	3.3738	3.2927	3.2296	3.1789	3.1373	2.9365	2.7872	2.7556	2.7072
10	4.9646	4.1028	3.7083	3.478	3.3258	3.2172	3.1355	3.0717	3.0204	2.9782	2.774	2.6211	2.5884	2.5384
11	4.8443	3.9823	3.5874	3.3567	3.2039	3.0946	3.0123	2.948	2.8962	2.8536	2.6464	2.4901	2.4566	2.405
12	4.7472	3.8853	3.4903	3.2592	3.1059	2.9961	2.9134	2.8486	2.7964	2.7534	2.5436	2.3842	2.3498	2.2967
13	4.6672	3.8056	3.4105	3.1791	3.0254	2.9153	2.8321	2.7669	2.7144	2.671	2.4589	2.2966	2.2614	2.207
14	4.6001	3.7389	3.3439	3.1122	2.9582	2.8477	2.7642	2.6987	2.6458	2.6022	2.3879	2.2229	2.187	2.1313
15	4.5431	3.6823	3.2874	3.0556	2.9013	2.7905	2.7066	2.6408	2.5876	2.5437	2.3275	2.1601	2.1234	2.0664
16	4.494	3.6337	3.2389	3.0069	2.8524	2.7413	2.6572	2.5911	2.5377	2.4935	2.2756	2.1058	2.0685	2.0102
17	4.4513	3.5915	3.1968	2.9647	2.81	2.6987	2.6143	2.548	2.4943	2.4499	2.2304	2.0584	2.0204	1.961
18	4.4139	3.5546	3.1599	2.9277	2.7729	2.6613	2.5767	2.5102	2.4563	2.4117	2.1906	2.0166	1.978	1.9175
19	4.3808	3.5219	3.1274	2.8951	2.7401	2.6283	2.5435	2.4768	2.4227	2.3779	2.1555	1.9795	1.9403	1.8787
20	4.3513	3.4928	3.0984	2.8661	2.7109	2.599	2.514	2.4471	2.3928	2.3479	2.1242	1.9464	1.9066	1.8438
21	4.3248	3.4668	3.0725	2.8401	2.6848	2.5727	2.4876	2.4205	2.3661	2.321	2.096	1.9165	1.8761	1.8124
22	4.3009	3.4434	3.0491	2.8167	2.6613	2.5491	2.4638	2.3965	2.3419	2.2967	2.0707	1.8894	1.8486	1.7838
23	4.2793	3.4221	3.028	2.7955	2.64	2.5277	2.4422	2.3748	2.3201	2.2747	2.0476	1.8648	1.8234	1.7577
24	4.2597	3.4028	3.0088	2.7763	2.6207	2.5082	2.4226	2.3551	2.3002	2.2547	2.0267	1.8424	1.8005	1.7338
25	4.2417	3.3852	2.9912	2.7587	2.603	2.4904	2.4047	2.3371	2.2821	2.2365	2.0075	1.8217	1.7794	1.7117
26	4.2252	3.369	2.9752	2.7426	2.5868	2.4741	2.3883	2.3205	2.2655	2.2197	1.9898	1.8027	1.7599	1.6913
27	4.21	3.3541	2.9603	2.7278	2.5719	2.4591	2.3732	2.3053	2.2501	2.2043	1.9736	1.7851	1.7419	1.6724
28	4.196	3.3404	2.9467	2.7141	2.5581	2.4453	2.3593	2.2913	2.236	2.19	1.9586	1.7689	1.7251	1.6548
29	4.183	3.3277	2.934	2.7014	2.5454	2.4324	2.3463	2.2782	2.2229	2.1768	1.9446	1.7537	1.7096	1.6384
30	4.1709	3.3158	2.9223	2.6896	2.5336	2.4205	2.3343	2.2662	2.2107	2.1646	1.9317	1.7396	1.695	1.623
40	4.0847	3.2317	2.8387	2.606	2.4495	2.3359	2.249	2.1802	2.124	2.0773	1.8389	1.6373	1.5892	1.5098
50	4.0343	3.1826	2.79	2.5572	2.4004	2.2864	2.1992	2.1299	2.0733	2.0261	1.7841	1.5757	1.5249	1.4392
60	4.0012	3.1504	2.7581	2.5252	2.3683	2.2541	2.1665	2.097	2.0401	1.9926	1.748	1.5343	1.4814	1.3903
70	3.9778	3.1277	2.7355	2.5027	2.3456	2.2312	2.1435	2.0737	2.0166	1.9689	1.7223	1.5046	1.4498	1.354
80	3.9604	3.1108	2.7188	2.4859	2.3287	2.2142	2.1263	2.0564	1.9991	1.9512	1.7032	1.4821	1.4259	1.3259
90	3.9469	3.0977	2.7058	2.4729	2.3157	2.2011	2.1131	2.043	1.9856	1.9376	1.6883	1.4645	1.407	1.3032
100	3.9362	3.0873	2.6955	2.4626	2.3053	2.1906	2.1025	2.0323	1.9748	1.9267	1.6764	1.4504	1.3917	1.2845

Continuación....

alfa =	grados de libertad del numerador													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100	1000
1	647.79	799.48	864.15	899.6	921.83	937.11	948.2	956.64	963.28	968.63	993.08	1009.8	1013.2	1018.2
2	38.506	39	39.166	39.248	39.298	39.331	39.356	39.373	39.387	39.398	39.448	39.481	39.488	39.498
3	17.443	16.044	15.439	15.101	14.885	14.735	14.624	14.54	14.473	14.419	14.167	13.992	13.956	13.903
4	12.218	10.649	9.9792	9.6045	9.3645	9.1973	9.0741	8.9796	8.9046	8.8439	8.5599	8.3604	8.3195	8.258
5	10.007	8.4336	7.7636	7.3879	7.1464	6.9777	6.853	6.7572	6.681	6.6192	6.3285	6.1225	6.08	6.016
6	8.8131	7.2599	6.5988	6.2271	5.9875	5.8197	5.6955	5.5996	5.5234	5.4613	5.1684	4.9589	4.9154	4.8498
7	8.0727	6.5415	5.8898	5.5226	5.2852	5.1186	4.9949	4.8993	4.8232	4.7611	4.4668	4.2544	4.2101	4.143
8	7.5709	6.0595	5.416	5.0526	4.8173	4.6517	4.5285	4.4333	4.3572	4.2951	3.9994	3.7844	3.7393	3.6709
9	7.2093	5.7147	5.0781	4.7181	4.4844	4.3197	4.197	4.102	4.026	3.9639	3.6669	3.4493	3.4034	3.3336
10	6.9367	5.4564	4.8256	4.4683	4.2361	4.0721	3.9498	3.8549	3.779	3.7168	3.4185	3.1984	3.1517	3.0805
11	6.7241	5.2559	4.63	4.2751	4.044	3.8806	3.7586	3.6638	3.5879	3.5257	3.2261	3.0035	2.9561	2.8835
12	6.5538	5.0959	4.4742	4.1212	3.8911	3.7283	3.6065	3.5118	3.4358	3.3735	3.0728	2.8478	2.7996	2.7257
13	6.4143	4.9653	4.3472	3.9959	3.7667	3.6043	3.4827	3.388	3.312	3.2497	2.9477	2.7204	2.6715	2.5962
14	6.2979	4.8567	4.2417	3.8919	3.6634	3.5014	3.3799	3.2853	3.2093	3.1469	2.8437	2.6142	2.5646	2.488
15	6.1995	4.765	4.1528	3.8043	3.5764	3.4147	3.2934	3.1987	3.1227	3.0602	2.7559	2.5242	2.4739	2.3961
16	6.1151	4.6867	4.0768	3.7294	3.5021	3.3406	3.2194	3.1248	3.0488	2.9862	2.6808	2.4471	2.3961	2.3171
17	6.042	4.6189	4.0112	3.6648	3.4379	3.2767	3.1556	3.061	2.9849	2.9222	2.6158	2.3801	2.3285	2.2483
18	5.9781	4.5597	3.9539	3.6083	3.382	3.2209	3.0999	3.0053	2.9291	2.8664	2.559	2.3214	2.2692	2.1878
19	5.9216	4.5075	3.9034	3.5587	3.3327	3.1718	3.0509	2.9563	2.8801	2.8172	2.5089	2.2696	2.2167	2.1341
20	5.8715	4.4612	3.8587	3.5147	3.2891	3.1283	3.0074	2.9128	2.8365	2.7737	2.4645	2.2234	2.1699	2.0862
21	5.8266	4.4199	3.8188	3.4754	3.2501	3.0895	2.9686	2.874	2.7977	2.7348	2.4247	2.1819	2.128	2.0431
22	5.7863	4.3828	3.7829	3.4401	3.2151	3.0546	2.9338	2.8392	2.7628	2.6998	2.389	2.1446	2.0901	2.0041
23	5.7498	4.3492	3.7505	3.4083	3.1835	3.0232	2.9023	2.8077	2.7313	2.6682	2.3566	2.1107	2.0556	1.9687
24	5.7166	4.3187	3.7211	3.3794	3.1548	2.9946	2.8738	2.7791	2.7027	2.6396	2.3273	2.0799	2.0243	1.9362
25	5.6864	4.2909	3.6943	3.353	3.1287	2.9685	2.8478	2.7531	2.6766	2.6135	2.3005	2.0516	1.9955	1.9065
26	5.6586	4.2655	3.6697	3.3289	3.1048	2.9447	2.824	2.7293	2.6528	2.5896	2.2759	2.0257	1.9691	1.879
27	5.6331	4.2421	3.6472	3.3067	3.0828	2.9228	2.8021	2.7074	2.6309	2.5676	2.2533	2.0018	1.9447	1.8537
28	5.6096	4.2205	3.6264	3.2863	3.0626	2.9027	2.782	2.6872	2.6106	2.5473	2.2324	1.9797	1.9221	1.8301
29	5.5878	4.2006	3.6072	3.2674	3.0438	2.884	2.7633	2.6686	2.5919	2.5286	2.2131	1.9591	1.9011	1.8082
30	5.5675	4.1821	3.5893	3.2499	3.0265	2.8667	2.746	2.6513	2.5746	2.5112	2.1952	1.94	1.8816	1.7877
40	5.4239	4.051	3.4633	3.1261	2.9037	2.7444	2.6238	2.5289	2.4519	2.3882	2.0677	1.8028	1.7405	1.6382
50	5.3403	3.9749	3.3902	3.0544	2.8326	2.6736	2.553	2.4579	2.3808	2.3168	1.9933	1.7211	1.6558	1.5465
60	5.2856	3.9253	3.3425	3.0077	2.7863	2.6274	2.5068	2.4117	2.3344	2.2702	1.9445	1.6668	1.599	1.4834
70	5.247	3.8903	3.309	2.9748	2.7537	2.5949	2.4743	2.3791	2.3017	2.2374	1.91	1.6279	1.5581	1.4371
80	5.2183	3.8643	3.2841	2.9504	2.7295	2.5708	2.4502	2.3549	2.2775	2.213	1.8843	1.5987	1.5271	1.4012
90	5.1962	3.8443	3.2649	2.9315	2.7109	2.5522	2.4316	2.3363	2.2588	2.1942	1.8644	1.5758	1.5028	1.3725
100	5.1786	3.8284	3.2496	2.9166	2.6961	2.5374	2.4168	2.3215	2.2439	2.1793	1.8486	1.5575	1.4833	1.3489

Continuación.....

alfa =	grados de libertad del numerador													
	0.01	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100
1	4052.2	4999.3	5403.5	5624.3	5764	5859	5928.3	5981	6022.4	6055.9	6208.7	6313	6333.9	6365.6
2	98.502	99	99.164	99.251	99.302	99.331	99.357	99.375	99.39	99.397	99.448	99.484	99.491	99.499
3	34.116	30.816	29.457	28.71	28.237	27.911	27.671	27.489	27.345	27.228	26.69	26.316	26.241	26.126
4	21.198	18	16.694	15.977	15.522	15.207	14.976	14.799	14.659	14.546	14.019	13.652	13.577	13.464
5	16.258	13.274	12.06	11.392	10.967	10.672	10.456	10.289	10.158	10.051	9.5527	9.202	9.13	9.0215
6	13.745	10.925	9.7796	9.1484	8.7459	8.466	8.26	8.1017	7.976	7.8742	7.3958	7.0568	6.9867	6.8811
7	12.246	9.5465	8.4513	7.8467	7.4604	7.1914	6.9929	6.8401	6.7188	6.6201	6.1555	5.8236	5.7546	5.6506
8	11.259	8.6491	7.591	7.0061	6.6318	6.3707	6.1776	6.0288	5.9106	5.8143	5.3591	5.0316	4.9633	4.8599
9	10.562	8.0215	6.992	6.4221	6.0569	5.8018	5.6128	5.4671	5.3511	5.2565	4.808	4.4831	4.415	4.3116
10	10.044	7.5595	6.5523	5.9944	5.6364	5.3858	5.2001	5.0567	4.9424	4.8491	4.4054	4.0819	4.0137	3.91
11	9.6461	7.2057	6.2167	5.6683	5.316	5.0692	4.886	4.7445	4.6315	4.5393	4.099	3.7761	3.7077	3.6035
12	9.3303	6.9266	5.9525	5.4119	5.0644	4.8205	4.6395	4.4994	4.3875	4.2961	3.8584	3.5355	3.4668	3.3619
13	9.0738	6.7009	5.7394	5.2053	4.8616	4.6203	4.441	4.3021	4.1911	4.1003	3.6646	3.3413	3.2723	3.1665
14	8.8617	6.5149	5.5639	5.0354	4.695	4.4558	4.2779	4.14	4.0297	3.9394	3.5052	3.1813	3.1118	3.0051
15	8.6832	6.3588	5.417	4.8932	4.5556	4.3183	4.1416	4.0044	3.8948	3.8049	3.3719	3.0471	2.9772	2.8695
16	8.5309	6.2263	5.2922	4.7726	4.4374	4.2016	4.0259	3.8896	3.7804	3.6909	3.2587	2.933	2.8627	2.7539
17	8.3998	6.1121	5.185	4.6689	4.336	4.1015	3.9267	3.7909	3.6823	3.5931	3.1615	2.8348	2.7639	2.6542
18	8.2855	6.0129	5.0919	4.579	4.2479	4.0146	3.8406	3.7054	3.5971	3.5081	3.0771	2.7493	2.6779	2.5671
19	8.185	5.9259	5.0103	4.5002	4.1708	3.9386	3.7653	3.6305	3.5225	3.4338	3.0031	2.6742	2.6023	2.4905
20	8.096	5.849	4.9382	4.4307	4.1027	3.8714	3.6987	3.5644	3.4567	3.3682	2.9377	2.6077	2.5353	2.4224
21	8.0166	5.7804	4.874	4.3688	4.0421	3.8117	3.6396	3.5056	3.3982	3.3098	2.8795	2.5484	2.4755	2.3615
22	7.9453	5.719	4.8166	4.3134	3.988	3.7583	3.5866	3.453	3.3458	3.2576	2.8274	2.4951	2.4218	2.3067
23	7.8811	5.6637	4.7648	4.2635	3.9392	3.7102	3.539	3.4057	3.2986	3.2106	2.7805	2.4471	2.3732	2.2571
24	7.8229	5.6136	4.7181	4.2185	3.8951	3.6667	3.4959	3.3629	3.256	3.1681	2.738	2.4035	2.3291	2.2119
25	7.7698	5.568	4.6755	4.1774	3.855	3.6272	3.4568	3.3239	3.2172	3.1294	2.6993	2.3637	2.2888	2.1706
26	7.7213	5.5263	4.6365	4.14	3.8183	3.5911	3.421	3.2884	3.1818	3.0941	2.664	2.3273	2.2519	2.1327
27	7.6767	5.4881	4.6009	4.1056	3.7847	3.558	3.3882	3.2558	3.1494	3.0618	2.6316	2.2938	2.218	2.0978
28	7.6357	5.4529	4.5681	4.074	3.7539	3.5276	3.3581	3.2259	3.1195	3.032	2.6018	2.2629	2.1867	2.0655
29	7.5977	5.4205	4.5378	4.0449	3.7254	3.4995	3.3303	3.1982	3.092	3.0045	2.5742	2.2344	2.1577	2.0355
30	7.5624	5.3903	4.5097	4.0179	3.699	3.4735	3.3045	3.1726	3.0665	2.9791	2.5487	2.2079	2.1307	2.0075
40	7.3142	5.1785	4.3126	3.8283	3.5138	3.291	3.1238	2.993	2.8876	2.8005	2.3689	2.0194	1.9383	1.8061
50	7.1706	5.0566	4.1994	3.7195	3.4077	3.1864	3.0202	2.89	2.785	2.6981	2.2652	1.909	1.8248	1.6847
60	7.0771	4.9774	4.1259	3.6491	3.3389	3.1187	2.953	2.8233	2.7185	2.6318	2.1978	1.8363	1.7493	1.6023
70	7.0114	4.9218	4.0744	3.5997	3.2907	3.0712	2.906	2.7765	2.6719	2.5852	2.1504	1.7846	1.6954	1.5422
80	6.9626	4.8807	4.0363	3.5631	3.2551	3.0361	2.8713	2.742	2.6374	2.5508	2.1153	1.7459	1.6548	1.496
90	6.9251	4.8491	4.0069	3.535	3.2276	3.0091	2.8445	2.7154	2.6109	2.5243	2.0882	1.7158	1.6231	1.4593
100	6.8953	4.8239	3.9837	3.5127	3.2059	2.9877	2.8233	2.6943	2.5898	2.5033	2.0666	1.6918	1.5977	1.4292

Continuación....

alfa =	grados de libertad del numerador													
	0.005	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100
1	16212	19997	21614	22501	23056	23440	23715	23924	24091	24222	24837	25254	25339	25466
2	198.5	199.01	199.16	199.24	199.3	199.33	199.36	199.38	199.39	199.39	199.45	199.48	199.48	199.51
3	55.552	49.8	47.468	46.195	45.391	44.838	44.434	44.125	43.881	43.685	42.779	42.15	42.022	41.829
4	31.332	26.284	24.26	23.154	22.456	21.975	21.622	21.352	21.138	20.967	20.167	19.611	19.497	19.327
5	22.785	18.314	16.53	15.556	14.939	14.513	14.2	13.961	13.772	13.618	12.903	12.402	12.3	12.145
6	18.635	14.544	12.917	12.028	11.464	11.073	10.786	10.566	10.391	10.25	9.5888	9.1218	9.0258	8.8808
7	16.235	12.404	10.883	10.05	9.522	9.1554	8.8853	8.6779	8.5138	8.3803	7.7539	7.3087	7.2166	7.0775
8	14.688	11.043	9.5965	8.8053	8.3019	7.9519	7.6941	7.4958	7.3387	7.2107	6.6082	6.1773	6.0875	5.952
9	13.614	10.107	8.7171	7.9558	7.471	7.1338	6.8849	6.6932	6.5411	6.4172	5.8319	5.4104	5.3224	5.1889
10	12.827	9.4269	8.0809	7.3428	6.8724	6.5447	6.3026	6.1159	5.9676	5.8467	5.274	4.8592	4.7721	4.6399
11	12.226	8.9121	7.6004	6.8808	6.4217	6.1016	5.8648	5.6821	5.5368	5.4183	4.8552	4.445	4.3585	4.2269
12	11.754	8.5097	7.2257	6.5211	6.0711	5.7571	5.5245	5.3451	5.2021	5.0854	4.53	4.123	4.0368	3.9053
13	11.374	8.1864	6.9258	6.2334	5.791	5.4819	5.2529	5.0761	4.9351	4.82	4.2703	3.8656	3.7795	3.6479
14	11.06	7.9217	6.6804	5.9983	5.5622	5.2573	5.0313	4.8566	4.7173	4.6034	4.0585	3.6553	3.5692	3.4372
15	10.798	7.7007	6.4761	5.8029	5.3722	5.0708	4.8473	4.6743	4.5363	4.4236	3.8826	3.4803	3.3941	3.2616
16	10.576	7.5138	6.3034	5.6378	5.2116	4.9134	4.692	4.5206	4.3839	4.2719	3.7342	3.3324	3.246	3.1129
17	10.384	7.3537	6.1557	5.4968	5.0745	4.7789	4.5594	4.3893	4.2535	4.1424	3.6073	3.2059	3.1192	2.9853
18	10.218	7.2148	6.0278	5.3747	4.9561	4.6628	4.4448	4.276	4.141	4.0304	3.4977	3.0962	3.0092	2.8746
19	10.073	7.0934	5.916	5.268	4.8526	4.5613	4.3449	4.177	4.0428	3.9329	3.402	3.0004	2.9131	2.7776
20	9.944	6.9865	5.8177	5.1743	4.7615	4.4721	4.2569	4.09	3.9564	3.847	3.3178	2.9159	2.8282	2.6918
21	9.8294	6.8915	5.7304	5.0911	4.6808	4.3931	4.1789	4.0128	3.8799	3.7709	3.2431	2.8408	2.7528	2.6154
22	9.727	6.8064	5.6524	5.0168	4.6088	4.3225	4.1093	3.944	3.8116	3.703	3.1764	2.7736	2.6852	2.5469
23	9.6347	6.73	5.5823	4.95	4.5441	4.2591	4.0469	3.8822	3.7502	3.642	3.1165	2.7132	2.6243	2.4851
24	9.5513	6.6609	5.519	4.8898	4.4856	4.2019	3.9905	3.8264	3.6949	3.587	3.0624	2.6585	2.5692	2.4291
25	9.4753	6.5982	5.4615	4.8351	4.4326	4.15	3.9394	3.7758	3.6447	3.537	3.0133	2.6088	2.5191	2.378
26	9.406	6.541	5.4091	4.7852	4.3843	4.1027	3.8928	3.7297	3.5989	3.4916	2.9685	2.5634	2.4733	2.3312
27	9.3423	6.4886	5.3611	4.7396	4.3402	4.0594	3.8501	3.6875	3.557	3.4499	2.9275	2.5217	2.4312	2.2882
28	9.2837	6.4404	5.317	4.6977	4.2996	4.0197	3.811	3.6488	3.5186	3.4117	2.8899	2.4833	2.3925	2.2485
29	9.2298	6.3958	5.2764	4.6591	4.2621	3.9831	3.7749	3.6131	3.4832	3.3765	2.8551	2.448	2.3566	2.2117
30	9.1798	6.3546	5.2388	4.6234	4.2276	3.9493	3.7415	3.5801	3.4505	3.344	2.823	2.4152	2.3234	2.1776
40	8.8278	6.0664	4.9758	4.3738	3.986	3.7129	3.5088	3.3498	3.222	3.1167	2.5984	2.1838	2.0884	1.9334
50	8.6256	5.9016	4.8259	4.2317	3.8486	3.5785	3.3764	3.2189	3.0921	2.9875	2.4702	2.0499	1.9512	1.7881
60	8.4947	5.795	4.729	4.1399	3.76	3.4918	3.2911	3.1345	3.0083	2.9042	2.3872	1.9622	1.8609	1.6904
70	8.4026	5.7204	4.6613	4.0758	3.698	3.4313	3.2315	3.0755	2.9498	2.846	2.3291	1.9002	1.7966	1.6196
80	8.3346	5.6652	4.6113	4.0285	3.6524	3.3867	3.1876	3.032	2.9066	2.8031	2.2862	1.854	1.7484	1.5655
90	8.2823	5.6228	4.5728	3.9922	3.6173	3.3524	3.1538	2.9987	2.8735	2.7701	2.2532	1.8182	1.7109	1.5226
100	8.2407	5.5892	4.5424	3.9634	3.5895	3.3252	3.1271	2.9722	2.8472	2.7439	2.227	1.7896	1.6809	1.4875

Continuación....

Alfa =	grados de libertad del numerador													
	0.001	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100
1	405312	499725	540257	562668	576496	586033	593185	597954	602245	605583	620842	631332	633240	636578
2	998.38	998.84	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31
3	167.06	148.49	141.1	137.08	134.58	132.83	131.61	130.62	129.86	129.22	126.43	124.45	124.07	123.46
4	74.127	61.249	56.17	53.435	51.718	50.524	49.651	48.996	48.472	48.05	46.1	44.747	44.471	44.049
5	47.177	37.122	33.2	31.083	29.751	28.835	28.165	27.649	27.241	26.914	25.393	24.331	24.113	23.789
6	35.507	27.001	23.705	21.922	20.802	20.031	19.463	19.03	18.688	18.412	17.12	16.214	16.029	15.749
7	29.246	21.69	18.772	17.197	16.207	15.52	15.018	14.634	14.33	14.083	12.931	12.118	11.951	11.698
8	25.415	18.494	15.829	14.392	13.484	12.858	12.398	12.045	11.767	11.54	10.479	9.728	9.5715	9.3369
9	22.857	16.387	13.901	12.56	11.714	11.129	10.697	10.368	10.106	9.8944	8.8976	8.1864	8.0381	7.8153
10	21.038	14.905	12.553	11.283	10.481	9.9262	9.517	9.2041	8.9558	8.7539	7.8035	7.1223	6.9804	6.7648
11	19.687	13.812	11.561	10.346	9.5788	9.0467	8.6548	8.3546	8.1163	7.9226	7.0077	6.3483	6.21	6.0004
12	18.645	12.973	10.805	9.6334	8.8921	8.3783	8.0008	7.7107	7.4797	7.2923	6.4047	5.7626	5.627	5.4215
13	17.815	12.313	10.209	9.0731	8.3546	7.8562	7.4888	7.2059	6.9822	6.7994	5.934	5.3046	5.1718	4.969
14	17.142	11.779	9.7298	8.622	7.9217	7.436	7.0777	6.8021	6.5829	6.4038	5.557	4.9376	4.8067	4.6061
15	16.587	11.34	9.3351	8.2528	7.567	7.0913	6.7412	6.4706	6.256	6.0809	5.2487	4.6375	4.5079	4.3092
16	16.12	10.97	9.0058	7.9444	7.2719	6.8048	6.4601	6.195	5.9836	5.8117	4.9918	4.3879	4.2592	4.0613
17	15.722	10.658	8.7266	7.6834	7.0222	6.5625	6.2237	5.9617	5.7539	5.5843	4.7753	4.1769	4.0486	3.8517
18	15.38	10.39	8.4874	7.4597	6.8076	6.3546	6.0209	5.7626	5.5575	5.3901	4.5898	3.9959	3.8685	3.6719
19	15.081	10.157	8.28	7.2655	6.6225	6.1755	5.8453	5.5907	5.3874	5.2219	4.4297	3.8397	3.7126	3.5161
20	14.819	9.9526	8.0981	7.0959	6.4606	6.0186	5.6921	5.4401	5.2391	5.0754	4.2901	3.703	3.5761	3.3799
21	14.586	9.7725	7.9381	6.9467	6.3183	5.8808	5.557	5.3078	5.1086	4.9463	4.1668	3.5827	3.4561	3.2596
22	14.381	9.6115	7.7962	6.8139	6.1914	5.758	5.4374	5.19	4.9931	4.8317	4.0579	3.4759	3.3492	3.1525
23	14.195	9.4687	7.6689	6.6957	6.0782	5.6489	5.3305	5.0854	4.8894	4.7296	3.9606	3.3804	3.2539	3.0568
24	14.028	9.3396	7.5543	6.5893	5.9767	5.5506	5.2351	4.9913	4.7967	4.638	3.8731	3.2946	3.1682	2.9706
25	13.877	9.2223	7.451	6.4929	5.8853	5.4615	5.1482	4.9063	4.713	4.5552	3.7944	3.2171	3.0905	2.8924
26	13.739	9.1168	7.3569	6.4056	5.8017	5.381	5.07	4.8292	4.6371	4.4802	3.7228	3.1466	3.02	2.8215
27	13.613	9.0195	7.2714	6.326	5.7262	5.3078	4.9981	4.7589	4.5679	4.4115	3.6575	3.0825	2.9556	2.7565
28	13.497	8.9303	7.1932	6.2532	5.6566	5.2405	4.9326	4.6948	4.5047	4.3492	3.598	3.0236	2.8967	2.6968
29	13.391	8.8485	7.1209	6.1864	5.5925	5.1791	4.8726	4.6357	4.4465	4.2917	3.5432	2.9695	2.8424	2.6419
30	13.293	8.773	7.0545	6.1245	5.5338	5.1223	4.8171	4.5816	4.3929	4.2387	3.4927	2.9197	2.7924	2.591
40	12.609	8.2509	6.5947	5.698	5.1282	4.7307	4.4356	4.2071	4.0243	3.8744	3.145	2.5736	2.4439	2.2349
50	12.222	7.9563	6.3364	5.4592	4.9013	4.5115	4.2223	3.9981	3.8185	3.6712	2.9506	2.3782	2.2459	2.0288
60	11.973	7.768	6.1714	5.3069	4.7567	4.3719	4.0864	3.8649	3.6873	3.5416	2.8265	2.2522	2.1175	1.8929
70	11.8	7.6366	6.0563	5.2009	4.6562	4.2753	3.9922	3.7726	3.5964	3.4518	2.7405	2.1643	2.0274	1.7958
80	11.672	7.5402	5.9722	5.1232	4.5825	4.2044	3.9231	3.7048	3.5297	3.3858	2.6773	2.0992	1.9604	1.7224
90	11.573	7.466	5.9076	5.0636	4.5261	4.15	3.8704	3.6532	3.4788	3.3356	2.6291	2.0491	1.9086	1.6647
100	11.496	7.4078	5.8567	5.0168	4.4815	4.1071	3.8285	3.6123	3.4386	3.2958	2.5909	2.0094	1.8674	1.6179

Continuación....

Alfa =	0.0005	grados de libertad del numerador													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100	10000	
1	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	3E+06	3E+06	3E+06	
2	1998.6	1998.6	1998.6	1998.6	2000.5	2000.5	2000.5	2000.5	2000.5	2000.5	2000.5	2000.5	2000.5	2000.5	
3	266.59	236.56	224.68	218.28	214.2	211.41	209.31	207.8	206.64	205.59	201.05	197.91	197.32	196.39	
4	106.23	87.428	80.094	76.136	73.633	71.916	70.664	69.704	68.947	68.336	65.542	63.563	63.184	62.573	
5	63.621	49.782	44.412	41.531	39.727	38.475	37.558	36.86	36.307	35.856	33.804	32.363	32.058	31.621	
6	46.071	34.794	30.457	28.114	26.645	25.633	24.891	24.324	23.88	23.516	21.828	20.649	20.409	20.045	
7	36.991	27.205	23.458	21.442	20.169	19.296	18.656	18.168	17.782	17.47	16.003	14.974	14.759	14.439	
8	31.556	22.752	19.387	17.579	16.44	15.658	15.079	14.639	14.29	14.006	12.686	11.751	11.558	11.263	
9	27.991	19.863	16.771	15.105	14.057	13.337	12.806	12.398	12.074	11.816	10.59	9.7189	9.5388	9.2659	
10	25.495	17.866	14.967	13.406	12.424	11.747	11.249	10.867	10.565	10.319	9.1641	8.3401	8.1673	7.909	
11	23.654	16.407	13.653	12.176	11.245	10.601	10.128	9.7643	9.4769	9.2423	8.1418	7.3505	7.185	6.934	
12	22.243	15.298	12.664	11.249	10.354	9.7389	9.2841	8.9349	8.6584	8.4347	7.3742	6.6102	6.4501	6.2064	
13	21.137	14.428	11.889	10.525	9.6625	9.0677	8.6293	8.2928	8.0254	7.8089	6.7812	6.0372	5.8808	5.6425	
14	20.242	13.733	11.27	9.9462	9.1113	8.5347	8.1091	7.7816	7.5215	7.3105	6.3101	5.5825	5.4288	5.1941	
15	19.507	13.162	10.765	9.4751	8.662	8.0981	7.6834	7.3651	7.1122	6.9049	5.9272	5.2123	5.0613	4.8294	
16	18.888	12.689	10.345	9.084	8.2891	7.738	7.3323	7.0204	6.7721	6.5702	5.6107	4.9067	4.7567	4.5275	
17	18.368	12.285	9.9899	8.7548	7.9744	7.4342	7.0368	6.7303	6.4865	6.2882	5.3442	4.6493	4.5011	4.2737	
18	17.921	11.943	9.6861	8.4729	7.7071	7.1759	6.7848	6.4829	6.2437	6.0481	5.1177	4.4306	4.2837	4.0573	
19	17.531	11.645	9.4242	8.2309	7.476	6.9531	6.5675	6.2701	6.0345	5.8417	4.9231	4.2419	4.0955	3.8699	
20	17.189	11.385	9.195	8.0181	7.2741	6.7594	6.3783	6.0854	5.8517	5.6616	4.753	4.0777	3.9322	3.7071	
21	16.887	11.156	8.9949	7.8326	7.0977	6.5884	6.2128	5.9226	5.6925	5.5043	4.6048	3.9336	3.789	3.5643	
22	16.622	10.952	8.8166	7.667	6.9413	6.4374	6.0663	5.7789	5.5506	5.3642	4.4729	3.8062	3.6616	3.4374	
23	16.382	10.772	8.6566	7.5206	6.8021	6.3028	5.9354	5.6516	5.4251	5.2405	4.3565	3.6925	3.5484	3.3242	
24	16.167	10.608	8.5147	7.3887	6.6775	6.1827	5.818	5.537	5.3124	5.1296	4.2514	3.5907	3.447	3.2228	
25	15.971	10.461	8.3855	7.2705	6.5647	6.0745	5.7125	5.4333	5.2105	5.0295	4.1573	3.4993	3.3556	3.1309	
26	15.796	10.328	8.2691	7.1623	6.4629	5.9763	5.617	5.3396	5.1186	4.9386	4.0718	3.4161	3.2724	3.0477	
27	15.632	10.206	8.1636	7.065	6.3692	5.8862	5.5297	5.2551	5.035	4.8558	3.994	3.3401	3.1969	2.9718	
28	15.483	10.095	8.0654	6.9749	6.2846	5.8053	5.4506	5.1768	4.959	4.7808	3.9231	3.271	3.1278	2.9022	
29	15.349	9.9917	7.9763	6.8922	6.2064	5.7298	5.3778	5.1059	4.889	4.7121	3.8581	3.2078	3.0641	2.8381	
30	15.221	9.8971	7.8944	6.8167	6.1355	5.6607	5.3105	5.0404	4.8249	4.6484	3.798	3.1491	3.0054	2.779	
40	14.352	9.2477	7.3287	6.2964	5.6434	5.1882	4.8517	4.5911	4.3838	4.2137	3.3883	2.7467	2.6016	2.3686	
50	13.861	8.883	7.0131	6.0072	5.3697	4.9258	4.5975	4.3428	4.1396	3.9727	3.1614	2.5216	2.3745	2.1339	
60	13.548	8.6511	6.8121	5.8235	5.1959	4.7594	4.4356	4.185	3.9845	3.8203	3.0172	2.3776	2.2283	1.9803	
70	13.33	8.4892	6.6739	5.6962	5.0759	4.6443	4.3242	4.0764	3.8776	3.7148	2.9179	2.2774	2.1262	1.8712	
80	13.169	8.371	6.5711	5.6025	4.9886	4.5602	4.2428	3.9963	3.7994	3.638	2.8451	2.2036	2.0505	1.789	
90	13.046	8.28	6.4938	5.5315	4.9213	4.4956	4.18	3.9358	3.7398	3.5789	2.7894	2.1469	1.9922	1.7247	
100	12.948	8.2091	6.4319	5.4752	4.8685	4.4452	4.1309	3.8876	3.6928	3.5325	2.7455	2.1021	1.9459	1.6728	

Continuación....

alfa =	grados de libertad del numerador														
	0.0001	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100	10000
1	4E+07	5E+07	5E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07	6E+07
2	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014	10014
3	784.17	694.77	659.38	640.75	627.71	620.26	614.67	609.08	605.36	603.5	588.6	581.15	577.42	575.56	
4	241.68	197.91	181.14	171.83	166.24	162.05	159.26	156.93	155.53	154.13	147.61	142.96	142.03	140.63	
5	124.8	97.09	86.38	80.559	76.834	74.506	72.643	71.246	70.082	69.267	65.193	62.282	61.7	60.885	
6	82.422	61.584	53.667	49.418	46.741	44.936	43.539	42.55	41.735	41.095	38.068	35.914	35.507	34.808	
7	62.166	45.169	38.65	35.216	33.062	31.549	30.501	29.628	28.987	28.464	25.961	24.243	23.865	23.341	
8	50.699	35.972	30.443	27.474	25.64	24.36	23.429	22.701	22.148	21.682	19.558	18.044	17.724	17.259	
9	43.481	30.326	25.408	22.759	21.1	19.965	19.15	18.51	17.986	17.579	15.687	14.319	14.043	13.621	
10	38.592	26.543	22.032	19.631	18.132	17.084	16.327	15.745	15.28	14.901	13.155	11.903	11.642	11.249	
11	35.041	23.865	19.66	17.419	16.022	15.047	14.348	13.795	13.373	13.024	11.394	10.215	9.9826	9.6043	
12	32.422	21.857	17.899	15.789	14.465	13.562	12.893	12.384	11.976	11.642	10.099	8.9931	8.7603	8.411	
13	30.384	20.314	16.56	14.552	13.286	12.427	11.787	11.307	10.914	10.601	9.1241	8.0618	7.8435	7.5015	
14	28.755	19.092	15.483	13.577	12.369	11.54	10.928	10.456	10.084	9.7862	8.3674	7.3414	7.1232	6.7957	
15	27.445	18.103	14.639	12.777	11.627	10.819	10.23	9.7789	9.4224	9.1313	7.7562	6.763	6.5556	6.2319	
16	26.368	17.302	13.926	12.136	11.016	10.23	9.6625	9.2259	8.8767	8.6002	7.2614	6.2937	6.0863	5.7698	
17	25.437	16.618	13.344	11.598	10.506	9.7498	9.1895	8.7675	8.4256	8.1491	6.8503	5.9008	5.6971	5.3878	
18	24.651	16.036	12.849	11.147	10.07	9.3351	8.7894	8.3746	8.0472	7.778	6.5047	5.5697	5.3697	5.0677	
19	23.982	15.541	12.42	10.754	9.7061	8.9858	8.4547	8.0472	7.7198	7.4579	6.2064	5.2896	5.0932	4.7912	
20	23.399	15.119	12.049	10.419	9.386	8.6802	8.1563	7.7562	7.4397	7.1814	5.9517	5.0459	4.8531	4.5547	
21	22.876	14.741	11.729	10.121	9.1095	8.411	7.9017	7.5088	7.1959	6.9413	5.7298	4.8349	4.6421	4.3474	
22	22.439	14.406	11.438	9.8589	8.8694	8.1782	7.6761	7.2905	6.9776	6.7303	5.5334	4.6493	4.4602	4.1655	
23	22.032	14.115	11.19	9.6334	8.6511	7.9744	7.476	7.0941	6.7885	6.5411	5.3624	4.4856	4.2965	4.0036	
24	21.653	13.853	10.965	9.4224	8.4547	7.7926	7.2978	6.9194	6.6211	6.3737	5.2096	4.3401	4.1509	3.8599	
25	21.333	13.621	10.761	9.2405	8.2873	7.6252	7.1377	6.7666	6.4683	6.2246	5.0713	4.2091	4.0218	3.7307	
26	21.042	13.402	10.579	9.0731	8.1272	7.4724	6.9922	6.6248	6.3301	6.09	4.9477	4.0909	3.9036	3.6143	
27	20.78	13.213	10.412	8.9203	7.989	7.3414	6.8649	6.4974	6.2064	5.9699	4.8349	3.9836	3.798	3.5088	
28	20.518	13.031	10.259	8.7821	7.858	7.2177	6.7448	6.381	6.0936	5.8571	4.733	3.8872	3.7016	3.4124	
29	20.3	12.864	10.121	8.6584	7.7416	7.105	6.6357	6.2792	5.9918	5.7553	4.6384	3.798	3.6125	3.3251	
30	20.096	12.718	9.9972	8.542	7.6325	6.9995	6.5374	6.1809	5.8972	5.6643	4.5547	3.7162	3.5325	3.2433	
40	18.67	11.7	9.1277	7.7598	6.8976	6.301	5.8644	5.5261	5.2569	5.035	3.9763	3.1641	2.9813	2.6903	
50	17.884	11.132	8.6511	7.3305	6.4974	5.9226	5.497	5.1696	4.9076	4.6948	3.6634	2.8631	2.6794	2.3829	
60	17.375	10.783	8.3528	7.0577	6.2464	5.6825	5.2678	4.9477	4.6912	4.482	3.4688	2.6721	2.4884	2.1855	
70	17.026	10.536	8.1491	6.8758	6.0754	5.5188	5.1095	4.793	4.5402	4.3347	3.3342	2.5411	2.3565	2.0464	
80	16.778	10.354	7.9963	6.7375	5.9481	5.3988	4.9949	4.6821	4.4329	4.2292	3.236	2.4456	2.2592	1.9431	
90	16.589	10.223	7.8799	6.6357	5.8535	5.3078	4.9076	4.5984	4.351	4.1473	3.1614	2.3729	2.1846	1.8626	
100	16.429	10.114	7.7926	6.5556	5.7771	5.2387	4.8385	4.5311	4.2855	4.0836	3.1032	2.3151	2.1264	1.7985	